

DANILO GOMES MORIEL

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ASTAXANTINA PELA
LEVEDURA *Phaffia rhodozyma*, UTILIZANDO PROCESSO
DESCONTÍNUO ALIMENTADO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, como pré-requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Tania Maria Bordin Bonfim

Co-orientadora: Prof.^a Iara Maria P. Machado

CURITIBA


2004

TERMO DE APROVAÇÃO

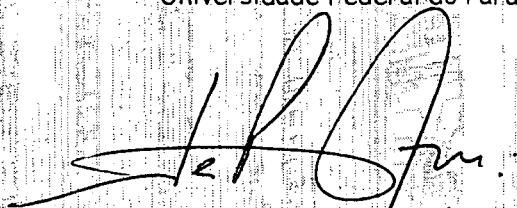
DANILO GOMES MORIEL

"OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E
ASTAXANTINA PELA LEVEDURA *Phaffia rhodozyma*,
UTILIZANDO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO".

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:



Prof.ª Dra. Tania Maria Bordin Bonfim (orientadora)
Departamento de Farmácia
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Nei Pereira Júnior
Departamento de Engenharia Bioquímica
Universidade Federal do Rio de Janeiro



Prof. Tit. José Domingos Fontana
Departamento de Farmácia
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 27 de janeiro de 2004

Danilo Gomes Moriel

Mestre em Ciências Farmacêuticas (UFPR)

Farmacêutico Industrial (UFPR)

Ao meu grande e eterno amor, Isabella.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Cid e à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade, confiança e apoio durante todas as etapas do trabalho. Espero, sinceramente, que seu esforço e dedicação para o sucesso do Programa sejam reconhecidos.

À Regina, pela prestatividade, dedicação e alegria no mínimo contagiante.

Ao professor Fontana, Maurício, Tânia, Carolina, Juliana e Jonathan, do Laboratório de Produção de Biomassa, pela compreensão e disponibilização da infraestrutura do Laboratório, sem restrições ou limitações, permitindo a concretização dos objetivos do trabalho. E, principalmente, pela amizade.

A todos os alunos e professores do Programa e do Curso de Farmácia que, de certa forma, contribuíram na realização do trabalho.

Às minhas orientadoras, Tania e Iara, pelo apoio irrestrito e incondicional, confiança e dedicação. Pela orientação pessoal e profissional. Pela amizade e por me tornarem parte de suas famílias. Pela oportunidade de trabalhar com vocês. Espero, sinceramente, que seja apenas o início de uma amizade.

À professora Miriam Blumel Chociai, pela oportunidade, confiança e dedicação ao trabalho.

A Viviane, pela sua alegria e amizade.

À minha esposa, pelas lágrimas e sorrisos que serviram de inspiração e alento nos momentos mais difíceis do trabalho.

À minha mãe e meu pai, por não entenderem o motivo de todo este trabalho mas depositarem total apoio nas minhas decisões.

Ao meu sogro e sogra, por acreditarem no meu potencial e capacidade, cujo apoio foi indispensável na concretização deste objetivo.

A todos aqueles que já se foram e que, de certa forma e de algum lugar especial, me ajudaram.

A minha força, coragem, perseverança, determinação e crença de que tudo o que queremos pode se tornar realidade, basta querer de verdade.

A Deus.

Look, if you had one shot or one opportunity
To seize everything you ever wanted in one moment
Would you capture it or just let it slip?

... The moment you own it you'd better never let it go
You only get one shot, do not miss your chance to blow
Cuz opportunity comes once in a lifetime

... So here I go, it's my shot
Feet fail me not
Cuz maybe it's the only opportunity that I got

... You can do anything you set your mind to, man.

EMINEM

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE GRÁFICOS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 ASTAXANTINA	4
3.1.1 Ocorrência	4
3.1.2 Propriedades Químicas	4
3.1.3 Aplicações	6
3.1.4 Produção	7
3.2 LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i>	9
3.2.1 Características Gerais	9
3.2.2 Aplicações da Levedura <i>Phaffia rhodozyma</i>	12
3.2.3 Biossíntese de Astaxantina e sua Regulação	16
3.2.4 Fatores Relacionados ao Crescimento e Produção de Astaxantina	22
3.2.5 Otimização da Produção	41
3.2.5.1 Melhoramento de cepas	41
3.2.5.2 Utilização de matérias-primas de baixo custo	45
3.2.5.3 Condução de bioprocessos	50
4 MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 MATERIAL	56
4.2 MÉTODOS GERAIS	56
4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS	57
4.3.1 Doseamento de Açúcares Totais	57
4.3.2 Determinação da Biomassa	57
4.3.3 Doseamento de Astaxantina	58
4.4 TRATAMENTO DO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR	59
4.5 MEIOS DE CULTIVO	59

4.5.1 Meio de Manutenção	60
4.5.2 Meio Pró-carotenogênico	60
4.5.3 Meio de Cultivo	60
4.5.4 Solução Nutritiva	61
4.6 CONSERVAÇÃO DO MICROORGANISMO	61
4.7 PREPARO DO INÓCULO	61
4.8 CULTIVO	62
4.8.1 Tempo	62
4.8.2 pH	62
4.8.3 Aeração e Agitação	63
4.8.4 Iluminação	63
4.8.5 Temperatura	64
4.8.6 Amostragem	64
4.8.7 Volume Inicial	64
4.8.8 Fonte de Nitrogênio e Concentração	64
4.8.9 Fonte de Carbono e Concentração	65
4.8.10 Anti-espumante	65
4.9 PROCESSOS ESTUDADOS	65
4.9.1 Processos Descontínuos	66
4.9.2 Processos Descontínuo Alimentado Intermitente	66
4.9.3 Processos Descontínuo Alimentado com Alimentação Contínua	67
4.9.4 Processos Descontínuo Alimentado Estendido	68
4.10 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS	69
4.10.1 Produtividade em Biomassa	69
4.10.2 Produtividade em Astaxantina	70
4.10.3 Rendimento em Biomassa	70
4.10.4 Rendimento em Astaxantina	71
4.10.5 Rendimento de Astaxantina em Relação à Biomassa	71
4.10.6 Fator de Conversão de Substrato em Biomassa	72
4.10.7 Fator de Conversão de Substrato em Astaxantina	72
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1 PROCESSOS DESCONTÍNUOS	73
5.2 PROCESSOS DESCONTÍNUO ALIMENTADO INTERMITENTE	79
5.3 PROCESSOS DESCONTÍNUO ALIMENTADO COM ALIMENTAÇÃO CONTÍNUA	83

5.4 PROCESSOS DESCONTÍNUO ALIMENTADO ESTENDIDO	86
6 CONCLUSÃO	100
REFERÊNCIAS	101

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	FÓRMULA ESTRUTURAL DA ASTAXANTINA	5
FIGURA 2 -	ISÔMEROS DA ASTAXANTINA	5
FIGURA 3 -	CULTURA EM PLACA DA LEVEDURA <i>P. rhodozyma</i>	10
FIGURA 4 -	VIA DO MEVALONATO ATÉ NEUROSPORENO	17
FIGURA 5 -	VIA BIOSSINTÉTICA DA ASTAXANTINA PROPOSTA PARA A LEVEDURA <i>P. rhodozyma</i>	21
FIGURA 6 -	CRESCIMENTO CELULAR E VARIAÇÃO NA PIGMENTAÇÃO NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO ESTENDIDO (250 g/l)	90

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS E FORMAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO NO PROCESSO DESCONTÍNUO	73
GRÁFICO 2 -	VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO INTERMITENTE	79
GRÁFICO 3 -	FORMAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO INTERMITENTE	80
GRÁFICO 4 -	VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS E FORMAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO COM ALIMENTAÇÃO CONTÍNUA	83
GRÁFICO 5 -	VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS E FORMAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO ESTENDIDO (100 g/l)	87
GRÁFICO 6 -	VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS E FORMAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO ESTENDIDO (250 g/l)	89
GRÁFICO 7 -	COMPARAÇÃO ENTRE OS RENDIMENTOS OBTIDOS NOS PROCESSOS ESTUDADOS	92
GRÁFICO 8 -	COMPARAÇÃO ENTRE AS PRODUTIVIDADES OBTIDAS NOS PROCESSOS ESTUDADOS	93
GRÁFICO 9 -	COMPARAÇÃO ENTRE OS FATORES DE CONVERSÃO OBTIDOS NOS PROCESSOS ESTUDADOS	94
GRÁFICO 10 -	COMPARAÇÃO DA PRODUTIVIDADE EM BIOMASSA OBTIDA NOS PROCESSOS ESTUDADOS COM VALORES DESCRITOS NA LITERATURA	95
GRÁFICO 11 -	COMPARAÇÃO DA PRODUTIVIDADE EM ASTAXANTINA OBTIDA NOS PROCESSOS ESTUDADOS COM VALORES DESCRITOS NA LITERATURA	96
GRÁFICO 12 -	COMPARAÇÃO DA PRODUTIVIDADE EM BIOMASSA OBTIDA NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO ESTENDIDO (250 g/l) ESTUDADO COM PROCESSOS DESCRITOS NA LITERATURA UTILIZANDO CEPAS SELVAGENS E MATÉRIAS-PRIMAS DE BAIXO CUSTO	97
GRÁFICO 13 -	COMPARAÇÃO DA PRODUTIVIDADE EM ASTAXANTINA OBTIDA NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO ESTENDIDO (250 g/l) ESTUDADO COM PROCESSOS DESCRITOS NA LITERATURA	

UTILIZANDO CEPAS SELVAGENS E MATÉRIAS-PRIMAS DE BAIXO CUSTO	98
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	RESULTADOS OBTIDOS NO PROCESSO DESCONTÍNUO	74
TABELA 2 -	PRODUTIVIDADE EM BIOMASSA DE PROCESSOS DESCONTÍNUOS E DESCONTÍNUO ALIMENTADO, UTILIZANDO CEPAS SELVAGENS OU MUTANTES DA LEVEDURA <i>P. rhodozyma</i> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO	76
TABELA 3 -	PRODUTIVIDADE EM ASTAXANTINA DE PROCESSOS DESCONTÍNUOS E DESCONTÍNUO ALIMENTADO, UTILIZANDO CEPAS SELVAGENS OU MUTANTES DA LEVEDURA <i>P. rhodozyma</i> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO	77
TABELA 4 -	RESULTADOS OBTIDOS NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO INTERMITENTE	80
TABELA 5 -	RELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO INTERMITENTE E OS RESULTADOS OBTIDOS NO PROCESSO DESCONTÍNUO ESTUDADO	81
TABELA 6 -	RESULTADOS OBTIDOS NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO COM ALIMENTAÇÃO CONTÍNUA	84
TABELA 7 -	RELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO COM ALIMENTAÇÃO CONTÍNUA E OS RESULTADOS OBTIDOS NOS PROCESSOS DESCONTÍNUO E DESCONTÍNUO ALIMENTADO INTERMITENTE ESTUDADOS	85
TABELA 8 -	RESULTADOS OBTIDOS NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO ESTENDIDO (100 g/l)	87
TABELA 9 -	RELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO ESTENDIDO (100 g/l) E OS RESULTADOS OBTIDOS NOS PROCESSOS DESCONTÍNUO, DESCONTÍNUO ALIMENTADO INTERMITENTE E COM ALIMENTAÇÃO CONTÍNUA ESTUDADOS	88
TABELA 10 -	RESULTADOS OBTIDOS NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO ESTENDIDO (250 g/l)	90
TABELA 11 -	RELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO ESTENDIDO (250 g/l) E OS RESULTADOS OBTIDOS NOS PROCESSOS DESCONTÍNUO, DESCONTÍNUO ALIMENTADO INTERMITENTE, COM ALIMENTAÇÃO CONTÍNUA E ESTENDIDO (100 g/l) ESTUDADOS	91

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

\$	- Dólar americano
%	- Por cento
°C	- Grau Celsius
µg	- Micrograma
µM	- Micromolar
µ _{máx}	- Taxa de crescimento específica máxima
µmol	- Micromol
λ _{máx}	- Comprimento de onda de absorção máxima
~	- Aproximadamente
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
A ^{1%} _{1cm}	- Absortividade molar
atm	- Atmosfera
<i>B.</i>	- <i>Bacillus</i>
C	- Carbono
C ₄₀ H ₅₂ O ₄	- Astaxantina
CAC	- Ciclo do ácido cítrico
CN ⁻	- Íon cianeto
CoA	- Coenzima A
Cu	- Cobre
Cu ²⁺	- Íon cuproso
DCD	- 3,3'-dihidróxi-β-ψ-caroten-4,4'-ona
DNA	- Ácido desoxiribonucleico
et al.	- E colaboradores
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
Fe	- Ferro
Fe ²⁺	- Íon ferroso
Fe ³⁺	- Íon férrico
g	- Grama
H	- Hidrogênio
h	- Hora
<i>H.</i>	- <i>Haematococcus</i>
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	- Ácido sulfúrico
HDC	- 4-hidróxi-3',4-dideidro-β-ψ-caroteno
HDCO	- 3-hidróxi-3,4-dideidro-β-ψ-caroten-4-ona

HMGC _o A	- Ácido hidróximetilglutárico CoA
HMGR	- Ácido hidróximetilglutárico CoA redutase
HMGS	- Ácido hidróximetilglutárico CoA sintase
HOCl·	- Ácido hipocloroso
K	- Potássio
KCN	- Cianeto de potássio
Kg	- Quilograma
l	- Litro
M	- Molar
mg	- Miligrama
ml	- Mililitro
mmol	- Milimol
Mn	- Manganês
Mn ²⁺	- Íon manganês (II)
N	- Nitrogênio
Na	- Sódio
NAD ⁺	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NaOH	- Hidróxido de sódio
nm	- Nanômetro
O	- Oxigênio
¹ O ₂	- <i>Singlet oxygen</i>
O ₂ ⁻	- Íon superóxido
O ₃	- Ozônio
OH·	- Radical livre oxigenado
p.	- Página
<i>P.</i>	- <i>Phaffia</i>
PP	- Pirofosfato
rpm	- Rotações por minuto
qsp	- Quantidade suficiente para
S	- Enxofre
SOD	- Superóxido dismutase
URSS	- União das Repúblicas Socialistas Soviéticas
vvm	- Volume de ar por volume de meio por minuto
YM	- <i>Yeast Media</i>
YNB	- <i>Yeast Nitrogen Base</i>

Zn	- Zinco
Zn^{2+}	- Ion zinco

RESUMO

Astaxantina é um carotenóide amplamente distribuído na natureza, sendo encontrado como principal pigmento em alguns crustáceos (camarão e lagosta), peixes (truta e salmão), pássaros (íbis e flamingo) e microorganismos (a levedura *Phaffia rhodozyma* e a alga *Haematococcus pluvialis*). É utilizada principalmente na criação em cativeiro de trutas e salmões, proporcionando a pigmentação característica destas espécies e aumentando a qualidade e aceitação de seus produtos no mercado. Em função do crescente mercado mundial, do elevado custo da astaxantina produzida sinteticamente e da necessidade de se obter astaxantina a partir de fontes naturais, em escala industrial, a um baixo custo e elevada produtividade, buscou-se a otimização da produção de biomassa e astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma*, utilizando processos fermentativos do tipo descontínuo alimentado e matérias-primas de baixo custo (caldo de cana-de-açúcar e uréia) como substratos. Obteve-se um processo, otimizado por processo descontínuo alimentado estendido, com produtividades em biomassa e astaxantina 4,55 e 4,73 vezes maiores do que as produtividades obtidas pelo processo fermentativo descontínuo, respectivamente. As elevadas produtividades obtidas neste processo otimizado são capazes de competir em produtividade com os processos encontrados na literatura e despertar interesse na produção industrial, em função da associação de processos de elevada produtividade em biomassa e astaxantina com meios de fermentação de baixo custo.

Palavras-chave: matérias-primas de baixo custo; otimização; *Phaffia rhodozyma*; processos descontínuo alimentado.

ABSTRACT

Astaxanthin is a carotenoid widely distributed in nature, being found as the main pigment in some crustaceans (shrimp and lobster), fish (trout and salmon), birds (flamingo and scarlet ibis) and microorganisms (the yeast *Phaffia rhodozyma* and the algae *Haematococcus pluvialis*). It is mainly used in the trout and salmon farming, providing the characteristic pigmentation of these fish and increasing the quality and consumer acceptance in the marketplace. Because of the increasing worldwide market and the high cost of synthetic astaxanthin, the need of astaxanthin obtained from natural sources, in scaled-up processes, at a low cost and high productivity, we looked for the optimization of the biomass and astaxanthin production by the yeast *Phaffia rhodozyma*, using fed-batch fermentation processes and low cost raw materials (sugar cane juice and urea) as substrates. It was obtained a process, optimized by fed-batch fermentation, with a biomass and astaxanthin productivity 4.55 and 4.73-fold the productivities obtained by the batch process fermentation, respectively. The high productivities obtained in this optimized process are able to compete in productivity with the processes found in the literature and arouse interest to the industrial production, because of the association of high biomass and astaxanthin productivity processes with low cost fermentation medium.

Key-words: fed-batch processes; low cost materials; optimization; *Phaffia rhodozyma*.

1 INTRODUÇÃO

Astaxantina é um carotenóide amplamente distribuído na natureza. É o principal pigmento encontrado em crustáceos (camarão e lagosta) e salmonídeos (salmão e truta), diversas aves (flamingo e íbis) e alguns microorganismos. Os carotenóides são responsáveis pela coloração vermelho-alaranjada destas espécies. Além disso, apresentam importantes funções metabólicas nos seres vivos, incluindo a conversão à vitamina A, o fortalecimento da resposta imune e proteção contra radicais oxigenados (JOHNSON; AN, 1991, p. 297).

Astaxantina é o principal pigmento utilizado na aquicultura, especialmente na criação de salmões e trutas. Estes organismos não são capazes de sintetizar carotenóides e, desta forma, estes pigmentos devem ser adicionados à sua alimentação para que possam ser incorporados e depositados na carne, conferindo a coloração característica da espécie e aumentando sua aceitação no mercado. A deposição de astaxantina em trutas e salmões é muito mais eficiente do que outros carotenóides. A maioria dos criadores utiliza astaxantina sintética, entretanto seu custo é elevado e suas formulações podem conter configurações indesejadas de astaxantina e seus derivados, diminuindo sua eficiência na pigmentação (JOHNSON; AN, 1991, p. 298).

Existe uma tendência mundial à utilização de fontes naturais de nutrientes e à exclusão de componentes sintéticos da cadeia alimentar. Estes fatores têm aumentado o interesse em fontes naturais de astaxantina. Diversas companhias estão investindo na obtenção de astaxantina por fontes naturais (MCCOY, 1999, p. 15-17). As fontes naturais mais promissoras de astaxantina são a microalga *Haematococcus pluvialis* e a levedura *Phaffia rhodozyma* (JOHNSON; AN, 1991, p. 298-299).

Quando comparada com a microalga *H. pluvialis*, a levedura *P. rhodozyma* é preferida como fonte industrial de pigmentos em função da capacidade de utilizar diversas fontes de carbono como substrato, apresentar uma taxa de crescimento relativamente rápida, alcançar alta densidade celular em fermentadores industriais, apresentar qualidade nutricional e segurança como aditivo alimentar (ACHEAMPONG; MARTIN, 1995, p. 147).

Entretanto, o cultivo da levedura *P. rhodozyma* em fermentadores apresenta um custo elevado quando comparada com outras leveduras, uma vez que requer um longo período de cultivo em baixas temperaturas (JOHNSON; AN, 1991, p. 320). A fim de diminuir os custos inerentes ao processo, matérias-primas de baixo custo podem ser utilizadas. Além disso, modelos fermentativos podem ser aplicados com o objetivo de aumentar as produtividades do processo.

O mercado de carotenóides é altamente promissor. Em 1999, o mercado mundial foi estimado em torno de \$786 milhões. Com um crescimento médio anual em torno de 2,9%, o mercado esperado para 2005 é de \$935 milhões. O segmento de rações é o de maior aplicação, estimado em \$462 milhões em 1999 e previsto em \$527 milhões em 2005. Astaxantina é o principal carotenóide comercializado, representando 28% das vendas. Desta forma, o mercado mundial de astaxantina em 1999 foi de \$221 milhões e a previsão para 2005, mantida a participação da astaxantina nas vendas, será de \$262 milhões (BCC, 2002)

O presente trabalho justifica-se pela crescente participação de astaxantina no mercado mundial, assim como pela necessidade de se obter astaxantina de fontes naturais, em escala industrial, a um baixo custo e com elevada produtividade.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é a otimização da produção de biomassa e astaxantina pela levedura *P. rhodozyma* em biorreatores, utilizando matérias-primas de baixo custo (caldo de cana-de-açúcar e uréia) e processos descontínuo alimentado.

Os objetivos específicos deste estudo são:

- a) desenvolver um processo capaz de suportar uma elevada produtividade de astaxantina e biomassa;
- b) obter produtividades em astaxantina e biomassa superiores às produtividades obtidas pelo processo descontínuo estudado;
- c) desenvolver um processo capaz de competir em produtividade com os processos encontrados na literatura e despertar interesse a nível industrial.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ASTAXANTINA

3.1.1 Ocorrência

Astaxantina é um carotenóide amplamente distribuído na natureza e o principal pigmento encontrado em crustáceos (camarão e lagosta) e salmonídeos (truta e salmão), vários pássaros incluindo certos flamingos e íbis, e muitos outros organismos (JOHNSON; AN, 1991, p. 297).

Certas algas verdes do subfilo *Chlorophyceae*, como *H. pluvialis*, *Neochloris wimmeri* e *Chlamydomonas nivalis* (VAZQUEZ; SANTOS; PARAJÓ, 1997, p. 263), também apresentam astaxantina como principal carotenóide, assim como a levedura *P. rhodozyma*. Algumas bactérias, incluindo *Mycobacterium lacticola* e *Brevibacterium* sp, também produzem astaxantina, assim como fungos do gênero *Peniophora* (JOHNSON; AN, 1991, p. 302-305).

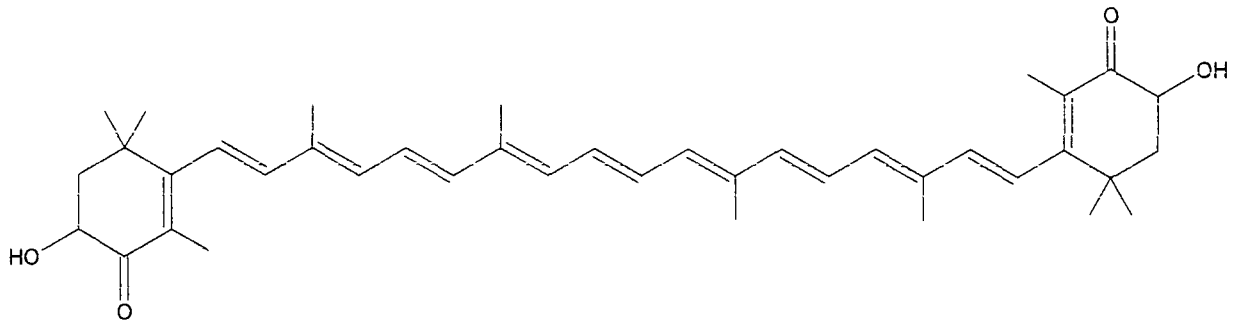
A bactéria *Halobacterium salinarium* também apresenta habilidade em acumular 3-hidroxiéquinenona e trans-astaxantina (CALO; GONZÁLEZ, 1995, p. 386).

É provável que existam na natureza outros microorganismos, além dos já conhecidos, que produzam astaxantina, especialmente em ambientes com condições altamente adversas, uma vez que os carotenóides apresentam a capacidade de proteger microorganismos heterotróficos contra luz e radicais oxigenados (JOHNSON; AN, 1991, p. 305).

3.1.2 Propriedades Químicas

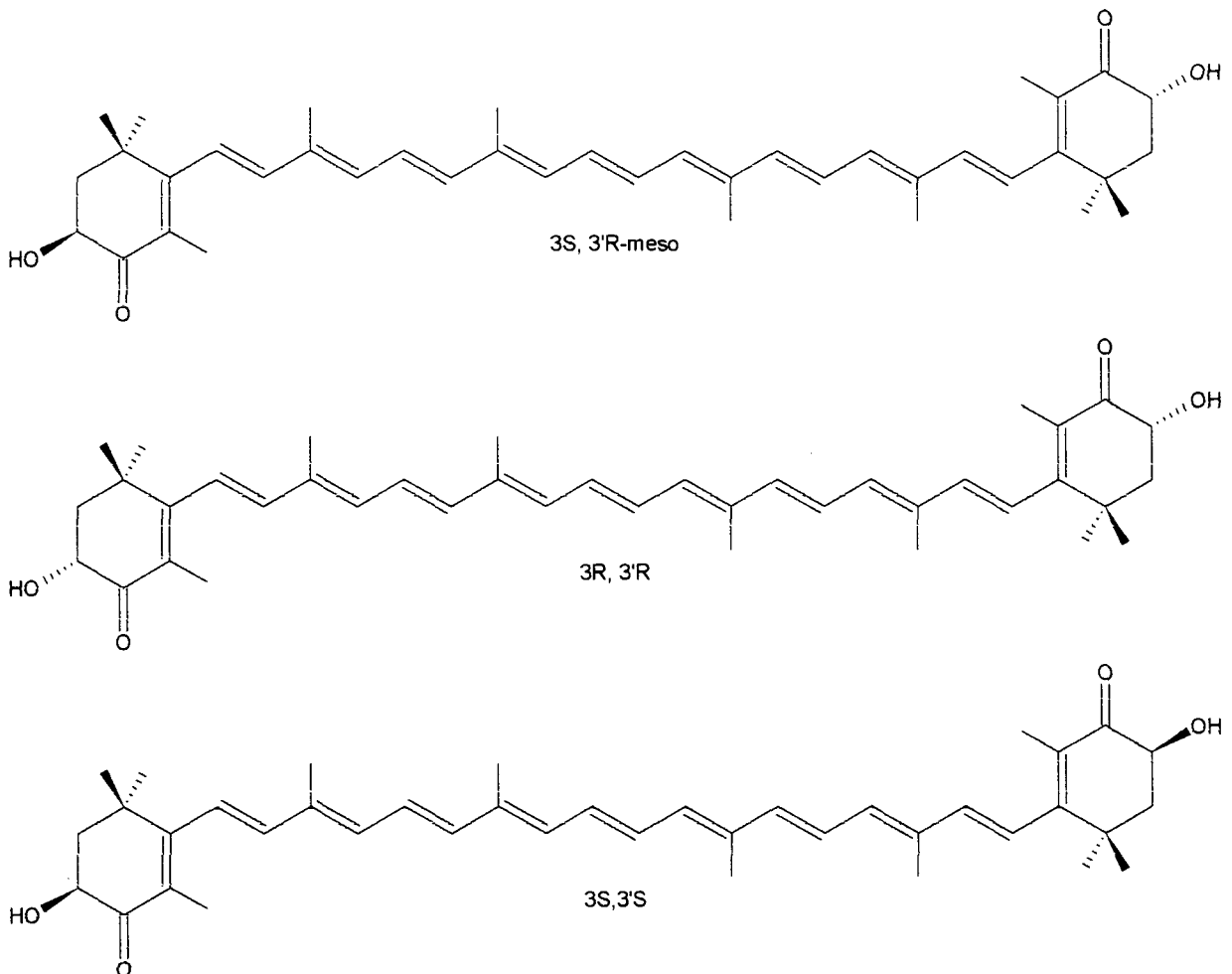
Astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4,4'-diona) é um oxicarotenóide de fórmula $C_{40}H_{52}O_4$ e peso molecular 596,86. Sua estrutura química (FIGURA 1) foi primeiramente identificada por Kuhn e Sorensen e posteriormente confirmada por Davis e Weedon (JOHNSON; AN, 1991, p. 299).

FIGURA 1 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA ASTAXANTINA



FONTE: JOHNSON, E. A.; AN, G. H. Astaxanthin from microbial sources. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 11, f. 4, p. 298, 1991.

FIGURA 2 - ISÔMEROS DA ASTAXANTINA



FONTE: JOHNSON, E. A.; AN, G. H. Astaxanthin from microbial sources. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 11, f. 4, p. 300, 1991.

Na forma cristalina e pura, aparece como um pó fino de coloração escura violeta amarronzada. Seu ponto de fusão é aproximadamente 224 °C. É insolúvel em solução aquosa e na maioria dos solventes, mas pode ser dissolvida a temperatura

ambiente em diclorometano (~30 g/l), clorofórmio (~10 g/l), acetona (0,2 g/l), dimetilsulfóxido (~0,5 g/l), e outros solventes não polares. Seu espectro de absorção representa um polieno conjugado, com $\lambda_{\text{máx}}$ de 489 nm em clorofórmio, 478 nm em etanol e 480 nm em acetona (JOHNSON; AN, 1991, p. 299).

Em função da longa cadeia de ligações duplas conjugadas, os carotenóides são menos estáveis do que outros isoprenóides. Desta forma, alguns cuidados devem ser tomados durante a extração e análise dos mesmos, a fim de se evitar artefatos ou destruição dos pigmentos, uma vez que luz, calor, ácidos e oxigênio são deletérios aos carotenóides, assim como algumas enzimas. Condições alcalinas também devem ser evitadas uma vez que promovem a conversão irreversível da astaxantina a astaceno (JOHNSON; AN, 1991, p. 299).

Astaxantina apresenta dois carbonos assimétricos nas posições 3 e 3'. Desta forma, pode ser encontrada em quatro configurações, incluindo os enantiômeros 3S, 3'S e 3R, 3'R, e as formas mesoméricas 3R, 3'S e 3'R, 3S (FIGURA 2). Todas estas configurações podem ser encontradas em fontes naturais de astaxantina, dentro de uma mesma espécie ou em espécies diferentes (JOHNSON; AN, 1991, p. 300).

3.1.3 Aplicações

A principal aplicação da astaxantina é na alimentação de salmonídeos (trutas e salmões) criados em cativeiro. Estes animais não são capazes de produzir astaxantina. Na natureza, adquirem pigmentação pela ingestão do zooplâncton. Entretanto, em cativeiro, um suprimento de astaxantina deve ser fornecido juntamente com a alimentação, para que seja absorvido e depositado na carne, conferindo a coloração característica destes peixes e aumentando a aceitação comercial de seus produtos.

No início da década de 80, a cantaxantina sintética era o principal pigmento utilizado na alimentação destes peixes. Entretanto, estudos demonstraram que a astaxantina apresenta superioridade como agente pigmentante e se deposita de maneira mais eficiente. Além disso, é o pigmento encontrado naturalmente nos salmonídeos (JOHNSON; AN, 1991, p. 298).

Também pode ser utilizada como suplemento na criação de aves e produção de ovos, com a finalidade de promover uma maior pigmentação em seus produtos e derivados, aumentando sua aceitação no mercado.

3.1.4 Produção

Astaxantina pode ser obtida de fontes naturais ou sintetizada por vias químicas com ou sem etapas microbiológicas. Também pode ser sintetizada a partir de intermediários de carotenóides, como cantaxantina (JOHNSON; AN, 1991, p. 302).

Os principais produtores de astaxantina sintética são a Roche e Basf, dominando 80% do mercado mundial. A Roche foi a primeira empresa a produzir astaxantina sintética. A síntese total da 3S,3'S-astaxantina é possível em função de sintonas opticamente ativas utilizando etapas catalíticas químicas e microbiológicas. As etapas microbiológicas envolvem modificações estereoseletivas em átomos de carbono e oxigênio específicos nos precursores. Desta forma, a combinação de etapas químicas e microbiológicas tem sido eficiente na preparação industrial de astaxantina quiral. Entretanto, algumas limitações das etapas microbiológicas podem ser encontradas, como baixo rendimento, baixa tolerância dos microorganismos pelo substrato, e dificuldade na recuperação e prevenção da conversão extensiva dos intermediários (JOHNSON; AN, 1991, p. 301-302).

Fontes naturais importantes na obtenção de astaxantina são os crustáceos (principalmente o camarão *Pandalus borealis* e os microcrustáceos *Euphanasia pacifica* e *Euphanasia superba*), a microalga *H. pluvialis* e a levedura *P. rhodozyma* (JOHNSON; AN, 1991, p. 299).

Crustáceos e seus derivados podem ser utilizados na obtenção de pigmentos. Na Noruega, resíduos de camarão (*Pandalus borealis*) têm sido tradicionalmente utilizados como fontes naturais de pigmentos para trutas e salmões. Entretanto, os níveis de carotenóides nas preparações obtidas a partir destes resíduos são geralmente baixos (0 a 200 mg/Kg) e uma pigmentação satisfatória requer a adição de 10 a 25% por peso de extrato quitinoso na dieta. Além disso, estes resíduos apresentam um nível elevado de cinzas, quitina e umidade, e níveis baixos de proteína e outros nutrientes, limitando a sua utilização. Um melhoramento

na extração e concentração dos carotenóides nestes resíduos poderia viabilizar sua utilização na pigmentação (JOHNSON; AN, 1991, p. 302; JOHNSON; CONKLIN; LEWIS, 1977, p. 2417).

Certas algas verdes do subfilo *Chlorophyceae* podem ser utilizadas como fonte de astaxantina. De acordo com o método e controle da cultura, elevados níveis de astaxantina podem ser acumulados na alga *H. pluvialis* (0,5% a 2% de astaxantina por grama de biomassa). Entretanto, a maioria da astaxantina (87%) aparece na forma esterificada, o que pode interferir na sua deposição e metabolismo em alguns animais. Além disso, a baixa deposição também pode estar relacionada com a diminuição na disponibilidade da astaxantina, uma vez que as algas altamente pigmentadas encontram-se na forma encistada, delimitada por uma espessa parede celular que dificulta a absorção dos pigmentos (JOHNSON; AN, 1991, p. 302-303).

A levedura *P. rhodozyma* aparece como a fonte mais promissora na obtenção de astaxantina por vias naturais. Em função de seu metabolismo quimioheterotrófico, apresenta algumas vantagens em relação à alga *H. pluvialis*. Cresce rapidamente (apesar de ser um microorganismo psicrófilo moderado) e atinge uma biomassa elevada em biorreatores. Além disso, pode ser cultivada em fermentações clássicas do tipo descontínuo (CALO; GONZÁLEZ, 1995, p. 386-387). Sintetiza astaxantina como principal carotenóide, não exige luz para o crescimento e pigmentação, pode ser cultivada em condições aeróbias e anaeróbias e apresenta uma taxa de crescimento entre 0,10-0,15 h⁻¹ (YAMANE et al., 1997b, p. 4471). Em relação aos crustáceos, pode apresentar uma concentração de astaxantina 10 a 30 vezes maior (JOHNSON; CONKLIN; LEWIS, 1977, p. 2417).

A utilização da levedura *P. rhodozyma* na alimentação de salmonídeos é autorizada pela FDA. A FDA classifica a levedura *P. rhodozyma* como um aditivo de coloração isento de certificação, podendo ser utilizada na alimentação de salmonídeos, a fim de promover a pigmentação da carne. Entretanto, deve ter um conteúdo mínimo de 0,4% de astaxantina no peso seco e o conteúdo total de astaxantina nas rações não deve exceder 80 mg/Kg (FDA, 2003).

Uma outra fonte que pode ser utilizada na obtenção de astaxantina é a bactéria *Halobacterium salinarum*. Comparativamente, esta bactéria apresenta uma vantagem importante sobre a levedura *P. rhodozyma*, uma vez que não apresenta

parede celular, facilitando os processos de extração de astaxantina (CALO; GONZÁLEZ, 1995, p. 386-387). Porém poucos trabalhos indicam a utilização desta bactéria como fonte industrial de astaxantina.

Outros microorganismos podem ser utilizados como fonte natural de astaxantina, como as bactérias *Mycobacterium lacticola* e *Brevibacterium* sp e os fungos do gênero *Peniophora*. Entretanto, os níveis de carotenóides são baixos ou então o crescimento é muito lento, descartando o interesse de produção industrial (JOHNSON; AN, 1991, p. 305).

Algumas empresas, como a Cyanotech e Aquasearch, produzem astaxantina natural utilizando a alga *H. pluvialis*. Outras, como Igene Biotechnology e Archer Daniels Midland, produzem astaxantina natural utilizando a levedura *P. rhodozyma*. Entretanto, empresas como Cyanotech e Igene apresentam uma produção mensal de astaxantina muito baixa (em torno de 75 Kg e 60 Kg, respectivamente) quando comparada com Roche (6 toneladas). A baixa produção e elevados custos de processo tornam difícil sua inserção no mercado mundial (McCOY, 1999, p. 15-17).

3.2 LEVEDURA *Phaffia rhodozyma*

3.2.1 Características Gerais

A levedura *P. rhodozyma* foi primeiramente isolada durante os anos 70 por Herman Phaff, Martin Miller, Minoru Yoneyama e Masumi Soneda, a partir de exsudatos obtidos de árvores decíduas no Japão, Alaska e antiga URSS. Phaff e colaboradores verificaram algumas características peculiares nas dez cepas obtidas, dentre elas a coloração vermelha a alaranjada (FIGURA 3) e a capacidade de fermentar glucose, maltose, sacarose e rafinose (JOHNSON; AN, 1991, p. 303).

Uma vez que todas as cepas foram isoladas de áreas montanhosas do Japão e Alaska, Phaff et al. propôs o nome de *Rhodozyma montanae*, descrevendo um novo gênero e espécie. Como este nome não atendia as exigências do Código de Nomenclatura Botânica, o gênero foi posteriormente alterado para *Phaffia*, em homenagem aos diversos anos que Phaff dedicou à pesquisa de leveduras (JOHNSON; AN, 1991, p. 303).

A levedura *P. rhodozyma* é um basidiomiceto e sua relação com os basidiomicetos foi estabelecida pela presença de uma parede celular multicamada e de brotamento enteroblástico. Além disso, esta relação é suportada pela composição de carboidratos presentes na parede celular (JOHNSON; AN, 1991, p. 304).

FIGURA 3 - CULTURA EM PLACA DA LEVEDURA *P. rhodozyma*



O gênero *Phaffia* é caracterizado pela síntese de pigmentos carotenóides, produção de compostos amilóides associados à superfície celular e um sistema coenzima Q-10. Outras propriedades incluem a capacidade de assimilar compostos carbonados, incluindo diversos mono, di e polissacarídeos. Além disso, cresce entre as temperaturas de 0 °C a 27 °C (JOHNSON; AN, 1991, p. 303-304).

A principal propriedade que distingue o gênero *Phaffia* de outros gêneros de leveduras relacionadas é a sua composição de carotenóides. ANDREWES, PHAFF e STARR (1976, p. 1003-1007) estudaram a composição de carotenóides da levedura *P. rhodozyma* 67-210. Todos os carotenóides encontrados não estavam na forma esterificada. Astaxantina foi o carotenóide encontrado em maior quantidade, correspondendo a 83,87% da mistura total. Embora astaxantina tenha sido isolada principalmente na sua configuração *trans*, todas as culturas apresentaram um isômero *cis*. Outros carotenóides foram isolados, como β -caroteno, γ -caroteno, neurosporeno, licopeno, equinenona, 3-hidroxi equinenona, 3-hidroxi-3,4-dideidro- β - ψ -caroten-4-ona (HDCO) e fenicoxantina.

AN, CHO e JOHNSON (1999, p. 189-193) também isolaram toruleno, β -zeacaroteno e 3,3'-dihidroxi- β - ψ -caroten-4,4'-ona (DCD).

PARAJÓ, SANTOS e VÁZQUEZ (1997, p. 139-141) encontraram também cantaxantina e 4-hidroxi-3',4-didehidro- β - ψ -caroteno (HDC) na cepa ATCC 24228.

ANDREWES e STARR (1976, p. 1009-1011) determinaram que a astaxantina produzida pela levedura *P. rhodozyma* apresentava uma configuração 3R, 3'R, ao contrário da astaxantina isolada de outras fontes naturais, como *H. pluvialis*, *Homarus gammarus*, *Halocynthia papillosa*, que apresentavam uma configuração 3S,3'S. Até aquele momento, acreditava-se que um carotenóide que continha um ou mais centros quirais sempre exibiria propriedades ópticas idênticas, independente da fonte de onde fosse isolado. Desta forma, este foi o primeiro exemplo de um carotenóide de ocorrência natural biossintetizado em diferentes formas ópticas.

Cepas selvagens da levedura *P. rhodozyma* apresentam em torno de 500 μ g de carotenóides totais por grama de biomassa, dos quais 40% a 95% são astaxantina. O conteúdo de astaxantina varia substancialmente de acordo com a cepa e o método de cultivo (JOHNSON; AN, 1991, p. 304).

PERSIKE et al. (2002, p. 79-85) observaram que a levedura *P. rhodozyma* era capaz de produzir invertase e urease, enzimas envolvidas na captação e incorporação de sacarose e uréia, respectivamente. Verificaram que estas enzimas eram produzidas na fase estacionária. Como são enzimas intracelulares, periplasmáticas e/ou associadas à parede celular, métodos físicos como ultra-som e abrasão foram utilizados na liberação destas enzimas. A utilização de abrasão com pérolas de vidro foi mais eficiente do que o ultra-som na liberação da invertase, ao contrário do que foi observado com a urease. A purificação destas enzimas pode ser realizada por cromatografia de afinidade seguida de cromatografia de troca iônica. Apesar do crescimento da levedura *P. rhodozyma* ser comprometido em temperaturas acima de 27 °C, as enzimas mostraram atividade máxima de hidrólise da sacarose e uréia a 60 °C e 50 °C, respectivamente. Isto indica que a atividade hidrolítica ou ação catalítica não é a condição limitante para o crescimento celular em elevadas temperaturas de incubação. A produção da invertase mostrou-se constitutiva. Entretanto, quando cultivada com celobiose, a atividade de invertase

aumentava em torno de três vezes. Os níveis de urease foram independentes da presença ou ausência de uréia no meio de cultivo. As duas enzimas apresentaram baixo ponto isoelétrico e pelo menos duas isoformas (isoenzimas).

Como os carotenóides estão relacionados com a proteção contra fotossensibilizadores e radicais oxigenados, acreditava-se que estivessem localizados intracelularmente em organelas que possam gerar radicais, como cloroplastos e mitocôndrias, ou na superfície da membrana de microorganismos expostos a elevadas intensidades de luz. Na levedura *P. rhodozyma*, verificou-se por microscopia de fluorescência que os carotenóides não estão localizados na mitocôndria nem no retículo endoplasmático, mas em glóbulos lipídicos e membranas celulares. Verificou-se também que culturas mais antigas continham mais carotenóides do que culturas mais jovens, além de uma maior quantidade de glóbulos lipídicos associados à membrana citoplasmática. Células mais jovens apresentavam um menor número de grandes glóbulos lipídicos. Por microscopia de transmissão eletrônica verificou-se que células mais antigas e mutantes hiperprodutoras apresentavam mitocôndrias de morfologia diferente quando comparada com células mais jovens ou com cepas com baixa produtividade de carotenóides. As cepas hiperprodutoras pareciam apresentar mitocôndrias menores e em maior quantidade do que as cepas selvagens. Essas observações sugerem que um estágio inicial da carotenogênese na levedura *P. rhodozyma* pode estar associado com as mitocôndrias e que os glóbulos lipídicos contêm carotenóides que se dispersam em direção da membrana celular com o envelhecimento da célula (JOHNSON; AN, 1991, p. 311-312).

3.2.2 Aplicações da Levedura *Phaffia rhodozyma*

Durante os últimos anos, a utilização da levedura *P. rhodozyma* tem sido estudada exaustivamente na alimentação de peixes e aves como aditivo de pigmentação, buscando uma melhoria na qualidade e aumento da aceitabilidade de seus produtos e derivados.

JOHNSON, CONKLIN e LEWIS (1977, p. 2417-2421) estudaram a utilização da levedura *P. rhodozyma* na alimentação de trutas (*Salmo gairdneri*) e lagostas (*Homarus americanus*). Verificaram que a lagosta apresentava uma deposição muito

baixa de pigmentos, enquanto a deposição era elevada quando alimentada com camarões de água salgada. Esta baixa deposição pode ser devido à configuração da astaxantina produzida pela levedura *P. rhodozyma*, que é diferente da encontrada em outras fontes naturais. Por outro lado, a deposição na truta foi maior do que quando alimentada com os mesmos camarões. Além disso, promoveu um ganho médio de peso em torno de 50%, indicando que a levedura *P. rhodozyma* é uma excelente fonte de astaxantina para a criação de salmonídeos.

FONTANA et al. (1996a, p. 123-124) analisaram a composição de aminoácidos da levedura *P. rhodozyma* e verificaram uma semelhança com *Saccharomyces cerevisiae*, exceto pelo baixo conteúdo de metionina, indicando que, além da sua aplicação como aditivo de pigmentação, pode ser utilizada como fonte de outros nutrientes.

A parede celular da levedura *P. rhodozyma*, em alguns casos, requer tratamento prévio para que possa ser utilizada na alimentação de algumas espécies. A parede celular é composta de β -glucose (na forma de 1,3- β -D-glucana e 1,6- β -D-glucana), α -glucose (como 1,3- α -D-glucana) em um complexo heteropolissacarídico formado por L-arabinose, D-xilose, D-ácido glucurônico e D-galactose. FONTANA et al. (1997, p. 310-311) verificaram a predominância de glucose e xilose, indicando a possível presença de uma xiloglucana. Esta parede celular peculiar torna a levedura *P. rhodozyma* resistente à digestão enzimática com zimoliase ou qualquer outra 1,3- β -D-glucanase incluindo suco de caramujo, sendo parcialmente digerida com um complexo lítico da bactéria *Bacillus circulans* WL-12 ou do fungo filamentoso *Trichoderma viride* (CALO; GONZÁLEZ, 1995, p. 387).

SANGHA, PATEL e MARTIN (1995, p. 53-56) verificaram que, quando tratadas com a enzima funcelase, as células da levedura *P. rhodozyma* eram capazes de liberar mais pigmentos do que quando tratadas mecanicamente com prensa francesa. A funcelase remove a cápsula da levedura, mas não sua parede celular. Entretanto, o tratamento realizado com esta enzima exige controle fino de pH e temperatura, aumentando o custo do processo e diminuindo sua aplicabilidade e praticidade.

A fim de se obter a levedura com conteúdo de astaxantina acessível, a levedura *P. rhodozyma* pode ser cultivada em fermentadores até o início da fase estacionária, com posterior inativação do cultivo pelo calor e inoculação com *B.*

circullans WL-12 ou *Trichoderma viride*. Ambos microorganismos crescem às custas da parede celular da levedura. Após 22h de crescimento bacteriano ou 60h de crescimento fúngico, a integridade física da levedura está praticamente perdida e toda a astaxantina pode ser extraída por solventes. A levedura degradada também pode ser utilizada diretamente na alimentação de peixes sem esta propriedade lítica (CALO; GONZÁLEZ, 1995, p. 387).

Entretanto, a utilização de calor na inativação das células pode causar uma degradação dos carotenóides. A fim de se evitar esta degradação, OKAGBUE e LEWIS (1983, p. 731-736) promoveram o crescimento da levedura *P. rhodozyma* e de *B. circulans* WL-12 em uma cultura mista em uma única etapa. A principal vantagem deste método é que a propagação e processamento da biomassa da levedura ocorrem em um único processo. Também promoveram o crescimento dos dois microorganismos separadamente e utilizaram o filtrado do cultivo de *B. circulans*, contendo apreciável atividade hidrolítica, no tratamento da biomassa da levedura, a fim de promover uma modificação na sua parede celular e permitir sua incorporação direta na ração, como fonte de astaxantina. Observaram que a idade da cultura da levedura *P. rhodozyma* e a concentração enzimática utilizada eram importantes na extractabilidade da astaxantina (porcentagem de astaxantina extraída diretamente com acetona, comparada com aquela extraída com tratamento ácido prévio seguido de extração por acetona). Quanto maior a concentração enzimática e idade da cultura, maior a extractabilidade, provavelmente em função de que, em idade avançada, a autólise da levedura ocorra, com possíveis modificações na parede celular. Em 72h de cultivo, utilizando uma concentração enzimática de 100 unidades líticas/ml, a extractabilidade de astaxantina foi de 70%.

OKAGBUE e LEWIS (1984a, p. 247-250) estudaram a autólise como uma ferramenta para o processamento da biomassa, a fim de garantir a preservação e, ao mesmo tempo, a extractabilidade da astaxantina. Verificaram que a utilização de água destilada e tampão citrato 0,02 M pH 7,0 promoviam uma extractabilidade de 78,2 e 72,2%, respectivamente. Os melhores resultados foram obtidos com tampão citrato 0,02 M pH 7,0 mais ditiotreitol 0,01 M (85,0%), entretanto a presença do grupamento tiol confere um odor forte que impede a sua utilização em rações para animais. Em função dos resultados, a água destilada e tampão citrato podem ser considerados como ferramentas eficientes de autólise e, desta forma, podem ser

utilizados para aumentar a extractabilidade da astaxantina, sua disponibilidade nutricional e absorção.

Também utilizando uma cultura mista, porém em uma única etapa, OKAGBUE e LEWIS (1985, p. 243-255) verificaram que a concentração inicial de glucose e o tamanho do inóculo da bactéria são fatores que afetam a extractabilidade da astaxantina produzida pela levedura. Em concentrações de açúcar maior que 1-2%, ocorre um aumento na concentração celular de astaxantina, mas uma diminuição na atividade enzimática e extractabilidade da mesma, provavelmente por uma repressão catabólica do açúcar residual ou inibição do metabolismo oxidativo. Inóculos grandes da bactéria aceleram a modificação da parede celular da levedura. Quando o inóculo da bactéria era quatro vezes maior que o da levedura, 80% de extractabilidade foi alcançada em 48h de cultivo. Estes autores também verificaram uma baixa produtividade de astaxantina neste tipo de cultivo (1,2 µg/ml), mas o método torna-se atrativo pela eficiente reutilização do meio de cultivo livre de células, com alta atividade lítica, na modificação de parede celular da levedura *P. rhodozyma* em cultivos puros.

FANG e WANG (2002, p. 1235-1245) utilizaram uma mutante da levedura *P. rhodozyma* hiperprodutora de astaxantina e *B. circulans* em cultivos descontínuos mistos de duas etapas. Obtiveram uma extractabilidade de 97% após 48h de incubação, na segunda etapa, com *B. circulans*.

A levedura *P. rhodozyma* também pode ser utilizada na criação de aves e produção de ovos, com a finalidade de promover uma maior pigmentação em seus produtos e derivados, aumentando sua aceitação no mercado. AKIBA et al. (2000b, p.162-170; 2000c, p. 77-84) verificaram a influência da adição da levedura *P. rhodozyma* na cama de frango, com relação à pigmentação da gema de ovos. Verificaram também que a levedura adicionada era capaz de promover um aumento na pigmentação da mesma e que a pigmentação aumentava com o aumento na concentração de astaxantina na dieta. No mesmo ano, AKIBA et al. (2000a, p. 255-260) verificaram que a utilização de células rompidas da levedura apresentava uma eficiência três vezes maior do que as células intactas. Comprovaram que a astaxantina apresentava uma eficiência 1,5 a 2 vezes maior que a páprica, um outro aditivo alimentar utilizado com o mesmo objetivo, despertando grande interesse na utilização da levedura *P. rhodozyma* na pigmentação de gema de ovos. AKIBA et al.

(2001a, p. 154-161) observaram que a utilização da levedura *P. rhodozyma*, rompida ou intacta, pode aumentar a coloração da carne de frangos. A alimentação com células rompidas apresentava uma eficiência maior do que com células intactas. Além disso, a pigmentação também era proporcional à concentração de astaxantina na dieta. AKIBA et al. (2001b, 147-153) verificaram que a pigmentação também é afetada pelo período de alimentação e idade das aves no início da mesma.

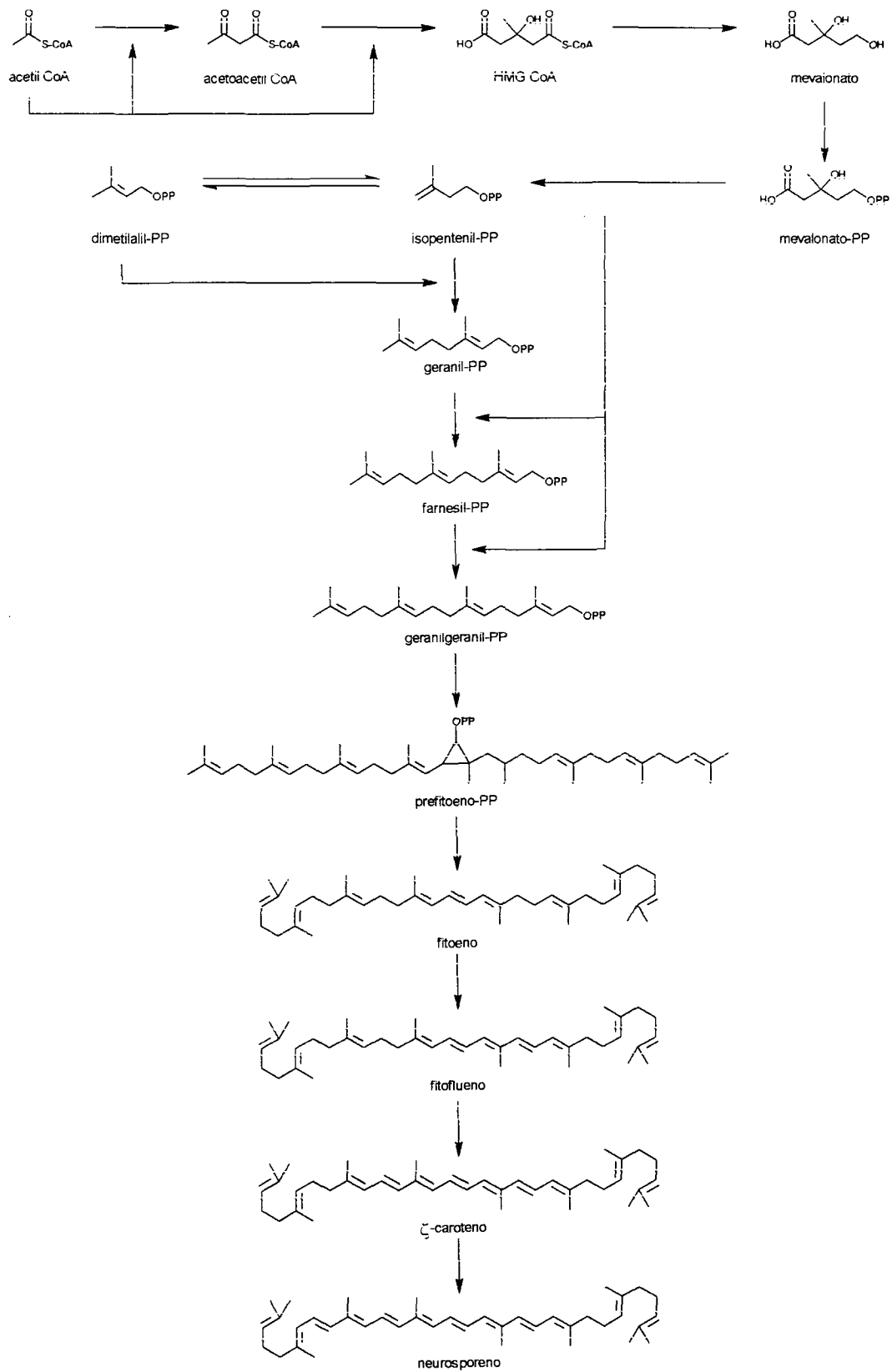
3.2.3 Biossíntese de Astaxantina e sua Regulação

Astaxantina é um tetraterpenóide produzido a partir da via do mevalonato. Nesta via, unidades de isopreno contendo cinco átomos de carbono são enzimaticamente combinadas, formando polímeros que podem apresentar diversas formas espaciais e muitas atividades biológicas. Dentre os poligômeros que podem ser obtidos temos o isopreno (C_5) e seus derivados, monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), giberelinas (C_{20}), esteróis (C_{30}), carotenóides (C_{40}) e *polirubbers* (C_n). Além dos isoprenóides, muitos outros compostos podem ser formados pela interação desta via com outras (biossíntese mista), como plastoquinonas e ubiquinonas, flavonóides, alcalóides, canabinóides e porfirinas (JOHNSON; AN, 1991, p. 305).

O ácido mevalônico é o primeiro precursor específico da unidade isopreno de cinco carbonos (FIGURA 4). Mevalonato é formado a partir de acetil CoA e acetoacetil CoA pela ação da ácido hidroximetilglutárico (HMG) CoA sintase e redutase (HMGS e HMGR, respectivamente) (JOHNSON; AN, 1991, p. 305).

Astaxantina e seus precursores são derivados do geranylgeranyl pirofosfato. A regulação das etapas a partir do geranylgeranyl pirofosfato para a síntese de carotenóides em fungos e plantas não está demonstrada. Fatores como compartimentalização de enzimas e substratos, regulação de metabolismo oxidativo, repressão de genes reguladores pela luz e outros fatores ambientais, controle cinético de enzimas biossintéticas individuais e processos de desenvolvimento podem exercer efeito no controle desta etapa da via (JOHNSON; AN, 1991, p. 306-308).

FIGURA 4 - VIA DO MEVALONATO ATÉ NEUROSPORENO



FONTE: JOHNSON, E. A.; AN, G. H. Astaxanthin from microbial sources. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 11, f. 4, p. 306, 1991.

A síntese do ácido mevalônico e sua conversão a geranylgeranyl pirofosfato em fungos multicelulares e leveduras é provavelmente mediada por enzimas solúveis. Em fungos, as enzimas carotenogênicas (fitoeno sintase e enzimas sucessivas) estão associadas à membrana e têm sido encontradas em microssomas e possivelmente em mitocôndrias. A grande compartimentalização confere uma grande complexidade à biossíntese de carotenóides, sendo possível que a síntese de isoprenóides ocorra coordenadamente em diversas localizações celulares. A formação de geranylgeranyl pirofosfato a partir de farnesil pirofosfato e isopentenil pirofosfato é realizada pela geranylgeranylpirofosfato sintase, identificada em plantas e fungos. Geranylgeranyl pirofosfato sofre uma condensação para formar o primeiro caroteno C₄₀, o fitoeno, a partir do intermediário prefitoeno pirofosfato. O fitoeno é então desidrogenado a licopeno. O neurosporeno é um intermediário nesta série de desidrogenações e a fitoeno desaturase está envolvida nesta etapa. Esta pode ser uma enzima importante no controle da síntese de carotenóides. Embora estudos *in vitro* indiquem que licopeno e neurosporeno podem ciclizar e formar β-caroteno e β-zeacaroteno, respectivamente, as enzimas ciclases ainda não foram isoladas (JOHNSON; AN, 1991, p. 308-310).

VERDOES, MISAWA e OUYEN (1999, p. 750-755) isolaram o primeiro gene relacionado à biossíntese de carotenóides na levedura *P. rhodozyma*. Denominado de *crtI*, era responsável pela codificação da fitoeno desaturase. A sequência de aminoácidos desta enzima mostrou elevada homologia com seqüências bacterianas e de organismos eucariotos, especialmente fungos. Um plasmídeo contendo regiões codificadoras da geranylgeranyl difosfato sintase e fitoeno sintase de *Erwinia uredovora*, além da *crtI*, foi introduzido em *Escherichia coli* e verificou-se um acúmulo de licopeno. Concluíram que as quatro didesidrogenações, de fitoeno a licopeno, são realizadas pelo produto de um único gene. Além disso, concluíram que o licopeno é o produto final das didesidrogenações na levedura *P. rhodozyma* e o substrato mais provável para ciclizações.

Pouco se sabe a respeito da hidroxilação que ocorre na etapa final da via, podendo envolver oxidases com funções mistas. A levedura *P. rhodozyma* parece sintetizar astaxantina a partir de β-caroteno. O β-caroteno é primeiramente convertido a equinenona e então hidroxilado a 3-hidroxi equinenona, como proposto por ANDREWES, PHAFF e STARR (1976, p. 1005-1007). Este intermediário é

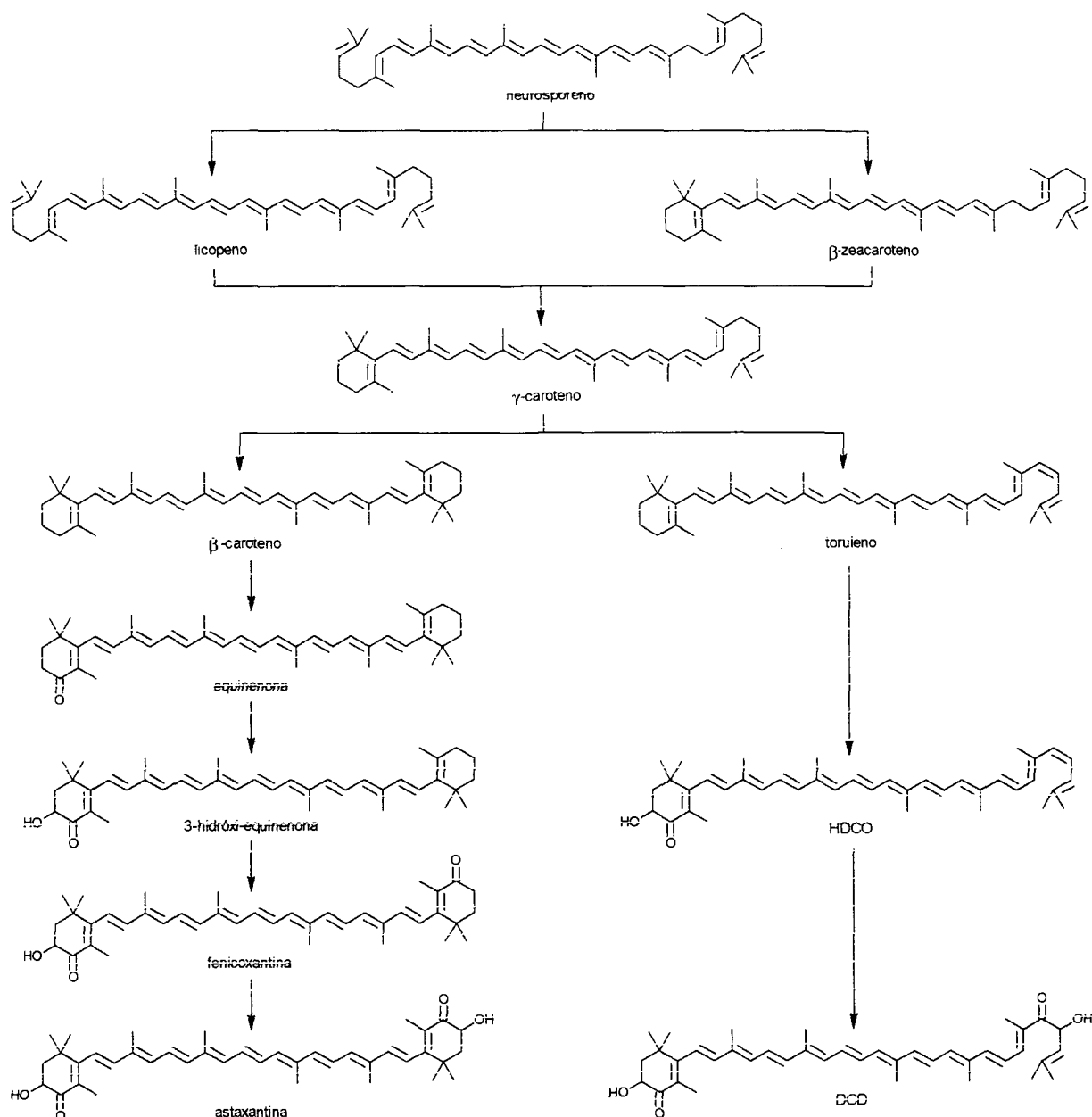
oxidado a fenicoxantina, que é posteriormente hidroxilada em C₃ para formar astaxantina. Outros intermediários possíveis na biossíntese de astaxantina, incluindo isocriptoxantina, cantaxantina e 3,4'-dihidroxi- β,β -caroten-4-ona, não foram encontrados na levedura *P. rhodozyma*. A isocriptoxantina seria formada a partir do β -caroteno, enquanto que a cantaxantina e 3,4'-dihidroxi- β,β -caroten-4-ona seriam formadas a partir da equinenona e hidroxiequinenona, respectivamente. ANDREWES, PHAFF e STARR (1976, p. 1005) encontraram o carotenóide HDCO mas não conseguiram inserir este carotenóide na sua via proposta, mas indicaram uma via alternativa onde HDCO seria formado a partir de γ -caroteno, apresentando toruleno ou 3-hidroxi- β - ψ -caroten-4-ona como possíveis intermediários, apesar de não ter identificado estes dois últimos carotenóides no estudo de sua cepa. JOHNSON e LEWIS (1979, p. 173-183), em condições de estresse, encontraram β -zeacaroteno e propuseram uma sub-via partindo do neurosporeno e formando β -caroteno, passando por γ -caroteno ou β -zeacaroteno. Nestas condições de estresse, β -zeacaroteno era acumulado, indicando uma possível biossíntese ineficiente dos carotenóides. Levantaram a hipótese de que talvez a síntese de zeaxantinas envolva um complexo enzimático com dois sítios ativos, cada um agindo em uma região da molécula do carotenóide, em sincronia e com similar eficiência, promovendo a desidrogenação e ciclização em uma mesma taxa. Em condições adversas, os dois sítios podem não agir em sincronia e formar produtos como β -zeacaroteno. Observaram também que, com um suprimento mínimo de oxigênio, a levedura tendia a acumular β -caroteno e seu derivado equinenona, sugerindo que a hidroxilação dos carotenóides é realizada apenas na presença de oxigênio.

AN, CHO e JOHNSON (1999, p. 189-193) estudaram a via biossintética dos carotenóides monocíclicos na levedura *P. rhodozyma*, utilizando inibidores da síntese dos carotenóides e analisando os carotenóides em mutantes carotenogênicos. Identificaram toruleno, na mutante produtora de β -caroteno ANY-1, e DCD. Utilizando butóxido de piperonil, um inibidor do citocromo P-450, estes autores verificaram uma inibição na desidrogenação dos carotenóides e, desta forma, um acúmulo dos carotenóides acíclicos e monocíclicos, como neurosporeno, licopeno, γ -caroteno, β -zeacaroteno. O efeito inibitório foi mais acentuado na cepa selvagem 67-385 do que na mutante hiperprodutora ant-1. O butóxido de piperonil

inibiu a desidrogenação e a produtividade de carotenóides, mas não inibiu a ciclização ou hidroxilação. Em função dos resultados, acredita-se que o butóxido de piperonil iniba a conversão do neurosporeno a licopeno, de β -zeacaroteno a γ -caroteno e deste a toruleno. Uma vez que a carotenogênese foi mais inibida na cepa selvagem do que na mutante, acredita-se que a mutante possua uma atividade de desidrogenase aumentada. A mutante ANy-1, produtora de β -caroteno, na presença de trietilamina ou 2-metilimidazol, acumulava toruleno e diminuía a concentração de β -caroteno. Quando a cepa selvagem 67-385 era crescida em meio contendo 2-metilimidazol ou trietilamina, a quantidade de HDCO, DCD, toruleno e β -zeacaroteno era aumentada e a de astaxantina diminuída. Supunha-se que HDCO aparecia na levedura *P. rhodozyma* como um precursor de astaxantina, um produto parcialmente degradado por radicais oxigenados ou um produto produzido pela inibição da ciclização. Constataram que HDCO aparecia como um precursor de DCD e que este é um produto final na via biossintética desta levedura. Desta forma, identificaram uma via biossintética de carotenóides monocíclicos, que origina DCD, em adição à via bicíclica, que origina astaxantina. Trietilamina e 2-metilimidazol podem não ter inibido a ciclização mas podem ter estimulado a ciclização de neurosporeno a β -zeacaroteno, ao invés de licopeno a β -caroteno, uma vez que licopeno não foi acumulado na presença destes dois inibidores, mas toruleno e β -zeacaroteno foram acumulados. Este resultado também sugere que γ -caroteno é um composto intermediário e que β -caroteno a partir de licopeno e toruleno a partir de β -zeacaroteno são preferencialmente formados.

Carotenos têm sido indiretamente chamados de precursores de astaxantina uma vez que eles apresentam estruturas idênticas, exceto pela ausência de grupos funcionais oxigenados. O fato de algumas mutantes da levedura *P. rhodozyma* produzirem β -caroteno e outros carotenóides não oxigenados, mas não xantofilas, indica que as xantofilas são produzidas a partir de carotenos nesta levedura (AN; CHO; JOHNSON, 1999, p. 192).

FIGURA 5 - VIA BIOSSINTÉTICA DA ASTAXANTINA PROPOSTA PARA A LEVEDURA *P. rhodozyma*



FONTE: AN, G. H.; CHO, M. H.; JOHNSON, E. A. Monocyclic carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 88, n. 2, p. 192, 1999.

Baseado nestas informações, AN, CHO e JOHNSON (1999, p. 192) propuseram que a levedura *P. rhodozyma* apresenta duas vias biossintéticas: uma monocíclica e uma bicíclica (FIGURA 5). A via bicíclica, é a originalmente proposta por ANDREWES, PHAFF e STARR (1976, p. 1003-1007). Na via monocíclica, DCD é produzido como produto final a partir de HDCO. A conversão de DCD a astaxantina é improvável uma vez que os níveis de astaxantina não estão

relacionados com os de DCD. Quanto maior a concentração de carotenóides, maior a utilização da via monocíclica. Este resultado sugere que as enzimas carotenogênicas formam complexos e que a mutação resulta em uma mudança na razão destas enzimas nestes complexos. O conteúdo de DCD e HDCO nas mutantes diminui a qualidade da levedura como fonte de pigmentos, uma vez que estes carotenóides dificilmente são encontrados na carne de salmão alimentado com a levedura *P. rhodozyma*. A obtenção de mutantes ou condições de cultivo que diminuam a concentração destes carotenóides é necessária, a fim de que se aumente a eficiência da pigmentação.

Algumas substâncias inibidoras da via dos isoprenóides têm sido muito importantes na compreensão da biossíntese de carotenóides e no isolamento de cepas hiperprodutoras de astaxantina. Dentre elas, podemos citar aquelas capazes de inibir a fitoeno desnaturase (fenilpiridazinonas, como norflurazon, difenilamina, β -ionina), ζ -caroteno desnaturase (amitrola, *N*-metilcarbamato e metoxifenona), licopeno ciclase (trietilaminas substituídas, como α -picolina, nicotina, imidazóis) e β -caroteno hidroxilase (como piperonilbutóxido e metirapone) (JOHNSON; AN, 1991, p. 310).

SANPIETRO e KULA (1998, p. 1007-1016) observaram que a nicotina era capaz de inibir a ciclização do licopeno, inibindo a licopeno ciclase, na levedura *P. rhodozyma*. Verificaram também que a difenilamina inibia de forma irreversível a oxidação do β -caroteno e impedia a desidrogenação do fitoeno, porém de forma reversível, promovendo o acúmulo dos mesmos.

3.2.4 Fatores Relacionados ao Crescimento e Produção de Astaxantina

Alguns fatores afetam diretamente o crescimento e produção de astaxantina pela levedura *P. rhodozyma*, como por exemplo tempo de cultivo, pH, temperatura, intensidade luminosa, fonte de carbono e aeração.

O tempo de cultivo é um fator importante na carotenogênese da levedura *P. rhodozyma*. Estudando a cepa UCD 67-210, JOHNSON e LEWIS (1979, p. 175) determinaram que a astaxantina é produzida principalmente durante a fase exponencial do crescimento. A sua produção continua mesmo quando o crescimento

cessa e a fonte de carbono se esgota, porém com uma menor taxa de produção. Desta forma, a produção de astaxantina está relacionada com o crescimento celular, embora sua produção não coincida com o aumento na biomassa.

MEYER e DU PREEZ (1993, p. 922-923) verificaram que o cultivo da levedura *P. rhodozyma* deve ser mantido na fase estacionária por um certo período que permita que o conteúdo intracelular de astaxantina atinja os valores máximos. A porcentagem de astaxantina no total de carotenóides crescia de 40% para 70% do final da fase exponencial para o final da fase estacionária, em cultivos alimentados com glucose ou ácido acético.

Como a produção de astaxantina é semi-associada ao crescimento da levedura *P. rhodozyma*, pois continua a ser sintetizada após o término do crescimento celular, acredita-se que esta levedura excrete um intermediário durante o crescimento, por exemplo um álcool, ácido acético, ou intermediário do ciclo do ácido cítrico, que é então reassimilado e estimule a carotenogênese durante a fase estacionária. A disponibilidade de fonte de carbono durante esta fase é importante para a síntese, uma vez que células em meio sem fonte de carbono não produzem astaxantina (JOHNSON; AN, 1991, p. 313).

SANGHA, PATEL E MARTIN (1995, p. 53-56) também verificaram que a produção estava relacionada ao crescimento e distinguiram três fases: a) fase 1, onde nenhum pigmento é encontrado; b) fase 2, onde ocorre a produção máxima dos pigmentos; e c) fase 3, onde ocorre um declínio na produção dos pigmentos.

PARAJÓ, SANTOS e VÁZQUEZ (1997, p. 139-141) comprovaram que a porcentagem de astaxantina dentre os carotenóides totais produzidos pela levedura *P. rhodozyma* depende da idade da cultura e concentração da fonte de carbono. Utilizando 20,3 g xilose/l, a porcentagem de astaxantina dentre o total de carotenóides era de 51% no início da fermentação e 70% no final (158h). Utilizando 41,7 g xilose/l, a porcentagem de astaxantina no início da fermentação era 75% e no final 84%. Isto indica que a porcentagem de astaxantina entre os carotenóides totais tende a aumentar com o aumento da idade da cultura e da concentração da fonte de carbono.

O pH do meio é um fator importante a ser considerado, uma vez que afeta o crescimento e produção de carotenóides pela levedura *P. rhodozyma*. O pH ótimo de cultivo varia muito em relação à cepa e ao meio utilizado, entretanto encontra-se na

faixa de 4,5-6,5. No pH de 4,5, JOHNSON e LEWIS (1979, p. 175-176) obtiveram a maior produtividade celular, a maior taxa de crescimento e a produção máxima de astaxantina. Em pH 3,5, a levedura passou a acumular β -zeacaroteno. Em pH 4,5, β -zeacaroteno não foi encontrado. O acúmulo de β -zeacaroteno pode ser um indicador da biossíntese ineficiente de carotenóides (JOHNSON; LEWIS, 1979, p. 182).

A produção de astaxantina também está vinculada à temperatura de cultivo. A temperatura ótima para crescimento e produção de pigmentos, determinada por JOHNSON e LEWIS (1979, p. 176-177), foi de 20 °C a 22 °C, sendo que em temperaturas maiores a produção de astaxantina diminuía consideravelmente. A temperatura ótima de crescimento varia principalmente em função da cepa selecionada, mas normalmente encontra-se entre 18-24 °C. A maior temperatura em que se pode observar crescimento da levedura é 27,5 °C.

A fonte de carbono utilizada no cultivo da levedura *P. rhodozyma* é um dos principais fatores a ser considerado. JOHNSON e LEWIS (1979, p. 178) verificaram a influência de diversas fontes de carbono no crescimento e pigmentação desta levedura. A melhor fonte de carbono utilizada foi celobiose, com um rendimento de 652 μ g astaxantina/g biomassa. Sacarose e D-maltose também induziram boa pigmentação (508 e 512 μ g/g biomassa, respectivamente). Embora succinato e glucono- δ -lactona tenham induzido um crescimento lento, estes compostos promoveram altas concentrações celulares de astaxantina (500 e 541 μ g/g biomassa, respectivamente). Pentoses, como L-arabinose e D-xilose, resultaram em baixo crescimento e pigmentação. A glucose, por sua vez, induziu uma elevada taxa de crescimento mas uma produção de astaxantina moderada (421 μ g/g biomassa).

PALÁGYI, FERENCZY e VÁGVÖLGYI (2001, p. 95-97) estudaram onze cepas da levedura *P. rhodozyma* em função da sua habilidade em utilizar 99 compostos como única fonte de carbono. Todas as cepas estudadas eram capazes de crescer em meio contendo D-xilose, D-glucose, D-manose, D-frutose, L-arabinose, L-xilose, sacarose, D-maltose, D-celobiose, D-rafinose, D-melejitose, amido, citidina, ácido 2-ceto-D-glucônico, ácido L-málico, etanol, β -metil-D-glucosídeo, arbutina, salicina, ácido oxalacético, ácido D-glucônico lactona, ácido acético e trealose. Porém nenhuma delas foi capaz de crescer em meio contendo D-ribose, D-galactose, L-ramnose, lactose, D-melibiose, xilana, dextrana, inulina,

glicerol, i-eritriol, galactitol, ribitol, mioinositol, xilitol, glicina, L-alanina, L-valina, L-leucina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-triptofano, L-serina, L-treonina, L-asparagina, L-cisteína, L-tirosina, L-lisina, L-arginina, L-histidina, β -alanina, L-ornitina, L-citrulina, uracila, citosina, timina, adenosina, dihidroxiacetona, γ -butirolactona, vanilina, ácido gálico, ácido L-hidroxibutírico, β -metil-D-galactosídeo, metil-D-xilosídeo, metil- α -D-manopiranosídeo, ácido cetoisovalérico, ácido protocatecuico, ácido ascórbico, D-glucosamina, ácido fumárico, ácido gentísico, ácido DL-isocítrico, metanol, ácido orótico, pectina, ácido tartárico e α -cetoglutarato. Alguns outros compostos foram utilizados por algumas cepas mas não por outras, em diferentes intensidades: D-arabinose, ácido aspártico, glicerol-1-monoacetato, ácido glucônico, ácido D-glucorônico, ácido L-glutâmico, L-glutamina, inosina, ácido 5-ceto-D-glucônico, ácido L-lático, D-lixose, D-manitol, α -metil-D-glucosídeo, L-prolina, ácido pirúvico, D-sorbitol, L-sorbose, ácido succínico e uridina. Alguns destes compostos utilizáveis pela levedura resultaram em uma alteração na coloração normal das colônias da levedura *P. rhodozyma*. D-manose e trealose aumentaram a pigmentação das colônias, enquanto que ácido acético, succínico, gálico, lático e α -metil-D-glucosídeo diminuíram a coloração das colônias, quando comparadas com colônias cultivadas em meio contendo glucose como fonte de carbono.

VAZQUEZ, SANTOS e PARAJO (1997, p. 263-268) estudaram o efeito de glucose, sacarose e xilose em oito cepas selvagens da levedura *P. rhodozyma* e verificaram que a produção de astaxantina e o perfil de carotenóides variavam de acordo com a cepa utilizada e a fonte de carbono. Astaxantina aparecia sempre em maior quantidade, entre 34-91% do total dos carotenóides encontrados. A concentração de astaxantina variou em relação à cepa estudada e à fonte de carbono utilizada (glucose: 34-100%; sacarose: 42-66%; xilose: 80-91%). A maior complexidade de carotenóides foi obtida utilizando sacarose como fonte de carbono. Outros carotenóides como cantaxantina, equinenona, 3-hidroxi equinenona, licopeno, HDC e fenicoxantina também foram detectados. A presença de β -caroteno foi verificada no início das fermentações, mas estava ausente no término das mesmas. A co-produção de xilitol também foi observada. A maior produtividade de carotenóides (3,60 mg/l, 391 μ g/g biomassa ou 0,021 mg/l/h) foi obtida com a cepa

NRRL Y-17268 cultivada com xilose. Neste caso, a concentração de astaxantina era de 82% dos carotenóides totais. As maiores biomassas foram obtidas nos cultivos com xilose.

Quando cultivada em sacarose, a cepa ATCC 24202 apresentou um rendimento em biomassa de 6,5 g/l e um rendimento em carotenóides de 0,89 mg/l ou 137 µg/g biomassa. Além disso, astaxantina correspondia a apenas 48% do total de carotenóides produzidos. Quando cultivada em xilose, o rendimento em biomassa aumentou para 8,2 g/l e o rendimento em carotenóides aumentou para 2,17 mg/l e 265 µg/g biomassa. Além disso, astaxantina correspondia a 78% do total de carotenóides. Quando cultivada em glucose, a porcentagem de astaxantina passou para 59% e os demais valores diminuíram (VAZQUEZ; SANTOS; PARAJO, 1997, p. 264-266).

AN, JANG e CHO (2001, p. 124) verificaram que, utilizando a mutante 2A2N na fermentação de melaço de beterraba, a sacarose é rápida e completamente metabolizada durante as primeiras horas da fase exponencial. Além disso, verificaram que a glucose é assimilada antes da frutose. Este comportamento também foi verificado por FONTANA et al. (1996b, p. 413-422) e MEYER e DU PREEZ (1994b, p. 781).

YAMANE et al. (1997a, p. 1109-1111) testaram diversas fontes de carbono no crescimento da cepa ATCC 24202 (frutose, xilose, maltose, sacarose, etanol, acetato e piruvato) e verificaram que o maior rendimento em biomassa era obtido com frutose (7,7 g/l), mas o maior conteúdo celular era obtido com etanol (0,52 mg astaxantina/g biomassa), porém com um rendimento em biomassa reduzido (2,14 g/l).

KUSDIYANTINI et al. (1998, p. 929-934) demonstraram que glicerol pode ser utilizado como fonte de carbono na produção de astaxantina pela levedura *P. rhodozyma* PR 190, obtendo um μ_x de 0,24 h⁻¹, um fator de conversão de 0,97 mg astaxantina/g glicerol, um rendimento em astaxantina de 33,7 mg/l, uma produtividade em astaxantina de 0,2 mg/l/h, um conteúdo celular de astaxantina de 1,8 mg/g biomassa e uma concentração de biomassa de 24,9 g/l. Do total de carotenóides obtidos, astaxantina correspondia a 78%.

PARAJÓ, SANTOS e VÁZQUEZ (1997, p. 139-141), utilizando a cepa ATCC 24228, observaram que, em meio contendo xilose como fonte de carbono, a

levedura *P. rhodozyma* realizava uma co-produção de carotenóides e xilitol. A produção de xilitol iniciava imediatamente após a fase lag, atingindo uma concentração máxima de 22 g/l após 73h de fermentação. Após a depleção de xilose no meio, observaram que o xilitol passava a ser consumido pela levedura.

A concentração de açúcares também influencia na produção de astaxantina. JOHNSON e LEWIS (1979, p. 178-179) observaram que à medida que aumentava a concentração de açúcares no meio, diminuía a concentração celular de astaxantina, assim como o fator de conversão de substrato em biomassa. SANTOPIETRO, SPENCER E SIÑERIZ (1998, p. 170) também verificaram que o aumento na concentração de glucose diminuía a taxa de crescimento específica máxima e a produtividade de biomassa.

REYNDERS, RAWLINGS e HARRISON (1997, p. 549-552) verificaram que a levedura *P. rhodozyma* estava sujeita ao efeito Crabtree, ou seja, que esta levedura era capaz de fermentar em condições aeróbias e altas concentrações de açúcares prontamente metabolizáveis (glucose), com conseqüente redução na biomassa e formação de etanol e ácido acético. Entretanto, o conteúdo de carotenóides não era afetado.

Em função dos dados apresentados, podemos verificar a importância da concentração e do tipo de fonte de carbono no crescimento e produção de astaxantina pela levedura *P. rhodozyma*. Podemos verificar também que esta levedura apresenta um metabolismo altamente heterotrófico, permitindo a utilização das mais variadas fontes de carbono no seu cultivo.

A aeração e a concentração de oxigênio no meio de cultivo também são fatores importantes para o crescimento e produção de astaxantina pela levedura *P. rhodozyma*, e estão intimamente relacionadas com a concentração da fonte de carbono.

YAMANE et al. (1997b, p. 4472-4473) estudaram a influência do oxigênio e a concentração de glucose no metabolismo primário e produção de astaxantina pela levedura *P. rhodozyma*. Verificaram que a levedura, em condições decrescentes de aerobiose, fermentava a glucose e produzia etanol (efeito Pasteur). Além disso, a taxa de crescimento específico, concentração final e produtividade de astaxantina diminuíram. Observaram também o efeito Crabtree, em função do aumento na

concentração de etanol, porém com uma diminuição na produtividade de astaxantina e biomassa.

Como a levedura *P. rhodozyma* é uma levedura capaz de fermentar glucose, esperava-se que o seu crescimento em baixas concentrações de oxigênio dissolvido e/ou altos níveis de glucose promoveriam o metabolismo fermentativo e possivelmente afetaria a produção de carotenóides. Quando cultivada em baixas concentrações de oxigênio, JOHNSON e LEWIS (1979, p. 179-182) verificaram um decréscimo no fator de conversão de substrato em biomassa, o que sugere que a levedura *P. rhodozyma* estava fermentando. Isto foi acompanhado por um decréscimo na concentração de astaxantina e acúmulo de β -caroteno e equinenona. De forma semelhante, quando cultivada em elevadas concentrações de glucose, o crescimento era verificado em função da diminuição do fator de conversão de substrato em biomassa e diminuição na concentração celular de astaxantina. Estes resultados mostram que a produção de astaxantina é inibida em condições fermentativas. Isto é suportado pelo fato de que a glucose, que é prontamente fermentada pela levedura *P. rhodozyma*, promoveu baixos níveis relativos de produção de astaxantina. Além disso, a celobiose que pode ser utilizada apenas aerobicamente pela levedura, estimulou alta produção de astaxantina, assim como succinato, que pode ser diretamente utilizado aerobicamente pelo ciclo do ácido cítrico.

AN, CHANG e JOHNSON (1996, p. 103-109) também verificaram que a aeração é um fator importante na produção de carotenóides pela levedura *P. rhodozyma* em shakers. Uma vez que a dissolução de oxigênio no meio de cultivo está intimamente relacionada com a agitação do mesmo, estudaram o efeito da agitação na produção de carotenóides. Constataram que os melhores resultados eram obtidos com uma agitação de 150 rpm. Porém, a mudança de 50 para 100 rpm no cultivo apresentou o maior aumento na produtividade, quando comparado com a mudança de 100 para 150 rpm.

YAMANE et al. (1997b, p. 4472-4473) estudaram o efeito da aeração no crescimento e produção de astaxantina. Verificaram que elevadas taxas de aeração promoviam uma repressão no efeito Crabtree, pois não foi detectada a formação de etanol em quantidades significativas. Além disso, com o aumento na concentração de glucose ocorria um aumento na produtividade de astaxantina e na concentração

de biomassa. Desta forma, para se manter alta produtividade de astaxantina, elevados níveis de oxigênio são necessários para reprimir o efeito Crabtree e outros efeitos inibitórios derivados de concentrações de glucose elevadas. Acredita-se que, em processos fermentativos (baixa concentração de oxigênio), ocorra um aumento na concentração de NADH que, por sua vez, iniba a síntese de astaxantina por retroinibição, uma vez que este é um produto final desta síntese. Quando a concentração de oxigênio é aumentada, o NADH em excesso é oxidado a NAD^+ , diminuindo a inibição. Além disso, o oxigênio participa na oxigenação de precursores na formação da astaxantina.

FANG e CHIOU (1996, p. 175-181) também estudaram o efeito da taxa de aeração no crescimento e produção de astaxantina pela mutante NCHU-FS501. As taxas estudadas foram 2.4, 3.2 e 3.6 vvm, com agitação de 400 rpm. Verificou-se que a maior taxa de aeração promovia o maior crescimento celular (6,66 g/l, comparada com 4,88 g/l a 2,4 vvm). Entretanto a produtividade de astaxantina não variou significativamente.

A fonte de nitrogênio utilizada no cultivo da levedura *P. rhodozyma* também é um fator importante na carotenogênese. AN (2001, p. 1006) estudou o efeito de várias fontes de nitrogênio na carotenogênese e produção de biomassa pela levedura *P. rhodozyma*. Dentre as fontes estudadas, o sulfato de amônio promoveu a maior concentração celular de carotenóides (420 $\mu\text{g/g}$ biomassa), comparado com oxalato de amônio (380 $\mu\text{g/g}$ biomassa), nitrato de amônio (390 $\mu\text{g/g}$ biomassa) e uréia (390 $\mu\text{g/g}$ biomassa) em uma concentração equimolar ao nitrogênio presente no meio YNB. Verificou também que elevados níveis de sulfato de amônio não eram capazes de inibir a carotenogênese. A mutante 2A2N não era capaz de crescer em baixas concentrações de sulfato de amônio (1,25 g/l), confirmando que as mutantes hiperprodutoras de astaxantina eram prejudicadas na utilização de nitrogênio.

PARAJÓ, SANTOS e VÁZQUEZ (1998a, p. 181-187) estudaram o efeito da suplementação de meio de cultivo contendo xilose, extrato de levedura, extrato de malte e peptona, com diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio, dentre elas nitrato e sulfato de amônio, e nitrato de potássio. Verificaram um aumento na produtividade de carotenóides, porém uma diminuição na biomassa com todas as fontes e concentrações estudadas. O maior rendimento em astaxantina foi 4,3 mg/l (5 mg carotenóides/l), obtida com 0,2 g/l de nitrato de potássio, enquanto que a maior

concentração celular de astaxantina obtida foi de 524 $\mu\text{g/g}$ biomassa (640 μg carotenóides/g biomassa), obtida com a suplementação de nitrato de amônio na concentração de 3 g/l. Estes resultados foram 1,5 vezes maiores do que os obtidos em meio sem adição de fonte inorgânica de nitrogênio (2,8 mg carotenóides/l). Verificaram que a adição de fontes de nitrogênio inorgânico aumentava o conteúdo de astaxantina nas células, independentemente da fonte utilizada. Através de otimização por superfície de resposta, obtiveram um rendimento de 5,2 mg astaxantina/l (5,8 mg carotenóides/l), 9,1 g/l de biomassa e 571 μg astaxantina/g biomassa (637 μg carotenóides/g biomassa).

A relação C/N também influencia na carotenogênese da levedura *P. rhodozyma*. YAMANE et al., (1997b, p. 4472-4473) verificaram que a produção de astaxantina era aumentada quando a levedura era cultivada em meio contendo alta relação C/N e que as maiores taxas de crescimento eram observadas em uma baixa relação C/N. Desta forma, foi realizada uma cultura em processo descontínuo alimentado em dois estágios: o primeiro, com uma alimentação com baixa relação C/N a fim de se obter elevada densidade celular; e o segundo, com uma alimentação mantendo uma elevada relação C/N a fim de se aumentar a produtividade de astaxantina. Desta forma, obteve-se uma biomassa de 33,6 g/l e um rendimento em astaxantina de 476 $\mu\text{g/g}$ biomassa. A elevada relação C/N promove um aumento na produção de astaxantina pois promove uma diminuição na síntese de aminoácidos e proteínas relacionadas à utilização de NADPH no metabolismo primário. Com a conseqüente diminuição de NADPH usado no metabolismo primário, ocorre um excesso de NADPH que é então utilizado na síntese de astaxantina.

Outro fator importante na produção de astaxantina é a luz, estando intimamente relacionada com a presença de radicais oxigenados. O crescimento e pigmentação da levedura *P. rhodozyma* é inibido por altas intensidades luminosas, mas é induzida por baixas intensidades, provavelmente em resposta à formação de radicais oxigenados intracelulares (JOHNSON; AN, 1991, p. 313). Entretanto, JOHNSON e LEWIS (1979, p. 181) verificaram que a luz não estimulava carotenogênese. É possível que a ausência de resposta à luz se deva às baixas intensidades luminosas utilizadas em seus experimentos.

AN e JOHNSON (1990, p. 191-203) verificaram a influência de elevadas intensidades luminosas no crescimento e produção de carotenóides pela levedura *P. rhodozyma*. Em elevadas intensidades luminosas, o crescimento era inibido e a produção de pigmentos diminuía. Por outro lado, as cepas estudadas apresentaram maior crescimento e produção de carotenóides no escuro. A composição dos pigmentos produzidos também era alterada pela luz, nos diversos comprimentos de onda estudados. Na presença da luz, especialmente branca e azul, a produção de β -zeacaroteno aumentava, enquanto β -caroteno e xantofilas como astaxantina, fenicoxantina e HDCO diminuía. Mutantes sensíveis à antimicina que produzem elevados níveis de pigmento mostraram uma sensibilidade aumentada à luz, especialmente à azul. Os carotenóides são conhecidos por reagirem com a luz e radicais oxigenados, promovendo proteção contra luz ultravioleta, *singlet oxygen* e luz visível. Entretanto, os autores demonstraram que cepas naturais ou mutantes que apresentam uma elevada pigmentação também apresentam uma maior sensibilidade à luz ultravioleta e visível. Além disso, as cepas mais pigmentadas apresentavam maior sensibilidade ao peróxido de hidrogênio. Estes dados indicam que outras moléculas fotorreativas, como flavinas ou porfirinas, estão mais associadas com a sensibilização à luz do que os carotenóides na levedura *P. rhodozyma*. As cepas mais fotossensíveis também sintetizam os maiores níveis de carotenóides, indicando que as flavinas ou porfirinas também participam na biossíntese dos carotenóides. Em meio líquido, o crescimento da cepa selvagem UCD-FST-67-385 era inibido por antimicina. A antimicina inibe o citocromo b da cadeia respiratória principal. Entretanto, esta inibição era revertida pela exposição do cultivo à luz. A luz também estimulou uma síntese de carotenóides duas vezes maior nestas células tratadas com antimicina, quando comparada com aquelas cultivadas no escuro. No escuro, a adição de antimicina não alterou consideravelmente a composição de carotenóides. A adição de antimicina sob luz aumentou a concentração de *cis* e *trans* astaxantina, indicando que a formação de precursores de astaxantina, principalmente a fenicoxantina, é susceptível à luz. A luz pode ter recuperado o crescimento pela indução de um sistema oxidativo alternativo que facilitava a oxidação do NADPH e a captura de elétrons enquanto a cadeia respiratória principal era inibida por antimicina. A indução de um sistema oxidativo alternativo, possivelmente uma flavinoxigenase ou um citocromo P-450 específico,

permite o crescimento em leveduras inibidas por antimicina e também estimula a biossíntese de carotenóides. Estes dados são comprovados pela cepa YAN-1, deficiente na expressão de enzimas oxidantes, que acumula β -caroteno em condições normais de cultivo, e passa a produzir xantofilas quando tratada com antimicina e luz. Os dados indicam que a oxigenação dos carotenóides à xantofilas ocorre em uma relação limitada, sendo alterada pela inibição da cadeia respiratória principal e indução de um sistema alternativo. Determinaram também que a síntese de proteínas citoplasmáticas era necessária para a reversão da inibição da antimicina pela luz. Além disso, determinaram que o sistema oxidativo é feito no citoplasma ou regulado por fatores produzidos no núcleo ou citoplasma. Além disso, verificaram que as células cultivadas na luz apresentavam um conteúdo lipídico menor que aquelas cultivadas no escuro. Estudos complementares são importantes para isolar e caracterizar as proteínas induzidas pela luz na presença de antimicina e mostrar sua participação na biossíntese de carotenóides oxigenados.

VÁZQUEZ e SANTOS (1998, p. 181-182) verificaram que, na presença de luz e cultivada em meio contendo xilose como única fonte de carbono, a levedura *P. rhodozyma* produzia astaxantina como principal carotenóide (83,4%), além de 3-hidroxiidroquinona (7,1%) e cantaxantina (9,5%). Entretanto, no escuro, HDCO era o único carotenóide produzido pela levedura (0,75 mg/l e 97 mg/Kg de biomassa). Este carotenóide nunca havia sido encontrado na levedura *P. rhodozyma* sendo produzido isoladamente. Este fato pode ser utilizado para a produção industrial deste carotenóide, uma vez que as etapas de separação de outros carotenóides não são necessárias.

PARAJÓ, SANTOS e VÁZQUEZ (1998b, p. 502) verificaram que, em ambientes iluminados, a produtividade volumétrica de carotenóides aumentava em 31% comparada com ambientes escuros.

SCHROEDER e JOHNSON (1995a, p. 502-507) também investigaram se extratos de *Betula papyrifera* (árvore hospedeira da levedura *P. rhodozyma*) continham algum composto que seria capaz de selecionar populações pigmentadas desta levedura. Quando as cepas foram expostas ao extrato e excitadas com luz ultravioleta, apenas as cepas pigmentadas foram capazes de crescer. Estes resultados sugerem que a carotenogênese ocorre em resposta à presença de compostos antifúngicos fotoativáveis produzidos pela árvore hospedeira. Além disso,

sugere que a carotenogênese nesta levedura tenha evoluído de forma a permitir sua sobrevivência na presença deste mecanismo de defesa.

A presença de espécies de oxigênio reativas também está relacionada ao crescimento e produção de carotenóides pela levedura *P. rhodozyma*. SCHROEDER e JOHNSON (1993, p. 907-12) estudaram a influência de O_2^- e peróxido de hidrogênio no crescimento e produção de carotenóides pela levedura *P. rhodozyma*. Adicionando duroquinona ao meio de cultivo, como gerador intracelular de O_2^- , verificou-se um aumento na produção de carotenóides em 50% na mutante anF-1P e 60% na cepa selvagem 67-385. Além de aumentar a síntese de carotenóides, verificou-se também um aumento na quantidade de xantofilas, como astaxantina, HDCO e 3-hidroxiéquinenona, juntamente com a diminuição na concentração dos carotenos, como β - e γ -caroteno. Além disso, verificou-se que quanto maior a idade da cultura, maior a resistência à duroquinona e, conseqüentemente, aos radicais O_2^- formados. Um fato interessante observado é que a atividade da superóxido dismutase (SOD) não variava entre as cepas estudadas, não sofria alteração na presença de duroquinona nem era modificada em função da idade do cultivo. A atividade da SOD era resistente à KCN e H_2O_2 , indicando a ausência de Cu/Zn-SOD (sensível à CN^-) e Fe-SOD (sensível à H_2O_2), localizadas no citosol, e a presença apenas da Mn-SOD (insensível a H_2O_2 e CN^-), localizada na mitocôndria. Em função da ausência destas enzimas no citosol, os carotenóides podem compensar o efeito antioxidante. Adicionando H_2O_2 ao meio de cultivo, os resultados obtidos eram o contrário daqueles obtidos com duroquinona, ou seja, durante a fase estacionária a sensibilidade ao H_2O_2 era maior, especialmente na mutante 2A2N. Na cepa selvagem, a resistência era praticamente constante. Entretanto, a atividade de catalase aumentava com o aumento na idade da cultura, nestas duas cepas estudadas. Comparada com a levedura *S. cerevisiae*, a atividade de catalase é baixa na levedura *P. rhodozyma*, indicando que os carotenóides também atuam diretamente contra os radicais peroxil, promovendo proteção antioxidante no citoplasma e em membranas lipídicas. Em função dos resultados obtidos, acredita-se que a biossíntese de carotenóides na levedura *P. rhodozyma* seja induzida por um mecanismo envolvendo espécies de oxigênio ativas. É possível que estas espécies ativas inibam ou destruam enzimas biossintéticas que utilizem acetil-CoA ou outros precursores que são comuns à síntese de carotenóides. Por outro lado,

elas podem induzir, ativar ou serem utilizadas como substrato para as enzimas envolvidas na formação dos carotenóides. A levedura *P. rhodozyma* produz diversos carotenóides oxigenados, incluindo DCD e HDCO, tidos como intermediários na biossíntese de astaxantina (JOHNSON; AN, 1991). Entretanto, a incubação da levedura *P. rhodozyma* em tampão com H_2O_2 resultou na formação de DCD e um carotenóide oxigenado não identificado, além de uma diminuição no conteúdo de astaxantina e HDCO. Estes resultados sugerem que certos carotenóides, incluindo aqueles rotulados como intermediários, podem ser produtos de uma degradação oxidativa. A levedura *P. rhodozyma* sofre importantes mudanças na resistência à O_2^- e H_2O_2 durante a transição para a fase estacionária, o período em que a produção de astaxantina é maior. Neste momento, as células devem ter uma maior exigência por antioxidantes para manter sua viabilidade. A astaxantina é mais efetiva como antioxidante do que β -caroteno, justificando sua produção. Estudos demonstraram que neste momento a respiração muda de sensível à insensível ao cianeto. A respiração insensível ao cianeto está relacionada com a produção de radicais superóxidos. É sugerido que a razão entre O_2^- e H_2O_2 é o maior determinante do grau de dano oxidativo intracelular, uma vez que estas espécies reagem na presença de metais de transição formando radicais hidroxilas, mais reativo (reação de Haber-Weiss). Como carotenóides e O_2^- não reagem diretamente, acredita-se que o O_2^- induza a formação de carotenóides que, por sua vez, podem reagir com os radicais H_2O_2 , alterando a razão de O_2^- e H_2O_2 , minimizando a formação de OH^\bullet e, conseqüentemente, o dano celular. Desta forma, os carotenóides produzidos pela levedura podem agir, juntamente com SOD e catalase, preservando a viabilidade da célula durante a produção contínua de radicais oxigenados durante o envelhecimento celular.

SCHROEDER e JOHNSON (1995b, p. 18374-18379) verificaram os efeitos de *singlet oxygen* (1O_2) e radicais peroxil na composição e biossíntese de carotenóides pela levedura *P. rhodozyma*. A geração de 1O_2 induzia o aumento de carotenóides em até 40%, mas não variava sua composição. Estes resultados indicam que a indução deve ocorrer em uma fase inicial da biossíntese e possivelmente afeta genes reguladores ou proteínas. A degradação destes radicais ocorre por uma alteração no estado de energia, sem alterar sua estrutura, ao contrário dos radicais peroxil que reagem covalentemente com os mesmos, sendo

posteriormente degradados. A exposição a radicais peroxil afetava a composição de carotenóides, diminuindo a concentração de astaxantina e aumentando a de carotenos, especialmente β -caroteno. Isto indica a possibilidade de que a astaxantina regule a síntese de carotenóides através da inibição, por retroinibição, da síntese de carotenos, no início da via. Com isso, acredita-se que a biossíntese de astaxantina seja um sistema cineticamente ativo, altamente regulado e dinâmico, envolvendo a indução por $^1\text{O}_2$, degradação de xantofilas por radicais peroxil e rápida reposição do *pool* de carotenóides quando as xantofilas são destruídas. Estes resultados parecem plausíveis, uma vez que o *habitat* natural desta levedura encontra-se no fluxo da seiva da árvore *Betula*, que contém um composto não-identificado que catalisa a formação de $^1\text{O}_2$ quando exposto à luz ultravioleta. Carotenogênese pode ter evoluído nesta levedura para garantir a sobrevivência à formação destes radicais no ambiente, letais para outros microorganismos. Verificou-se também a formação de um novo pigmento, derivado da degradação oxidativa por peróxidos, denominado dehidroflexixantina.

No mesmo ano, SCHROEDER e JOHNSON (1995a, p. 502-507) também estudaram o efeito de $^1\text{O}_2$ na astaxantinogênese e crescimento da levedura *P. rhodozyma*. Em sistemas biológicos, $^1\text{O}_2$ pode ser gerado na luz, por ativação de moléculas fotossensíveis, ou no escuro pela degradação de peróxidos ou radicais de oxigênio, através da peroxidação de lipídios ou peroxidases. Induz danos ao DNA e promove a oxidação de proteínas. Neste estudo, utilizaram cepas não produtoras de carotenóides (AF-1), produtoras de β -caroteno (YAN-1), hiperprodutora de astaxantina (ENM 5) e selvagem (67-385). Verificaram que as cepas AF-1 e YAN-1 apresentaram um menor crescimento em meio contendo $^1\text{O}_2$ gerado pela luz, sendo que na cepa AF-1 o efeito era mais acentuado. Apesar de produzir β -caroteno, a cepa YAN-1 foi mais afetada no crescimento do que a ENM 5 e 67-385 porque o β -caroteno é um antioxidante menos eficiente que astaxantina. Aumentando a concentração de $^1\text{O}_2$, verificou-se que a cepa hiperprodutora apresentava melhor crescimento do que a cepa selvagem, provavelmente porque as mutantes apresentem um *pool* de carotenóides que garanta sua sobrevivência. Estes resultados demonstram o papel dos carotenóides na proteção contra substâncias antifúngicas fotogeradas, como $^1\text{O}_2$. A levedura *P. rhodozyma* é deficiente em

enzimas que participam na detoxificação de espécies oxigenadas ativas. Este efeito é compensado pelos carotenóides.

AN, CHANG e JOHNSON (1996, p. 103-109) estudaram o efeito de radicais oxigenados e aeração na carotenogênese e crescimento da levedura *P. rhodozyma*. Verificaram que a adição de succinato+ Mn^{2+} diminuía a carotenogênese. Succinato+ Mn^{2+} é capaz de eliminar O_2^- . Verificaram também que o aumento da concentração de duroquinona (gerador de O_2^- intracelular) no meio de cultivo aumentava a produção de carotenóides pela levedura. A cepa mutante estudada apresentava maior susceptibilidade à duroquinona do que a cepa selvagem, indicando a presença de mutação mitocondrial produzindo radicais oxigenados. Ao mesmo tempo, a adição de *scavengers* de radicais oxigenados (ascorbato+ Cu^{2+} e dimetilsulfóxido) ao meio diminuía significativamente a produção de carotenóides. Desta forma, O_2^- influencia na carotenogênese. Verificaram que o aumento na produção de carotenóides pelos radicais oxigenados era observado na fase de crescimento, mas não na fase estacionária. Estudaram também o efeito de radicais oxigenados internos e externos na carotenogênese, utilizando H_2O_2 como uma fonte externa de radicais e antimicina como uma fonte interna, em função da inibição do complexo citocromo bc_1 . Os dois tratamentos aumentaram a concentração total de carotenóides por aumentar a produção de HDCO. Porém o efeito da antimicina na composição e conteúdo celular dos carotenóides foi mais significativo. Desta forma, constataram que radicais oxigenados internos ativam a carotenogênese, enquanto os radicais externos sensibilizam a célula. Verificaram também que a adição de H_2O_2 e antimicina no escuro diminuía levemente a produção de carotenóides, indicando que a luz possa inativar alguma proteína reguladora associada com radicais oxigenados, ativando a carotenogênese. Sabe-se que a enzima SOD forma H_2O_2 a partir de radicais O_2^- . Por sua vez, radicais O_2^- inibem a catalase, aumentando a concentração intracelular de H_2O_2 . Os radicais O_2^- reagem com H_2O_2 , formando radicais OH^\bullet . Assim, estes radicais também devem apresentar um papel importante na carotenogênese.

A aeração utilizada nos processos pode não produzir radicais oxigenados, uma vez que a agitação vigorosa não aumenta significativamente a produção de carotenóides. A utilização de métodos capazes de produzir radicais oxigenados

internos no lugar da aeração pode ser eficiente no aumento da produção de carotenóides pela levedura *P. rhodozyma*.

SCHROEDER et al. (1996, p. 2923-2929) desenvolveram uma seleção genética positiva de cepas hiperprodutoras de astaxantina baseado na geração de radicais $^1\text{O}_2$ no escuro. As cepas estudadas (67-385, selvagem; AF-1, mutante albino; Yan-1, mutante produtora de β -caroteno; ENM 5 e anF-1P, mutantes hiperprodutoras de astaxantina) foram submetidas a tratamento com ozônio ou uma mistura de ácido hipocloroso (HOCl) e H_2O_2 , ambos capazes de gerar radicais $^1\text{O}_2$. Utilizando a mistura de HOCl e H_2O_2 , as cepas hiperprodutoras de astaxantina foram selecionadas, indicando maior resistência aos radicais $^1\text{O}_2$. O mesmo aconteceu utilizando O_3 na geração de radicais $^1\text{O}_2$. Também verificaram que as cepas mutantes hiperprodutoras e selvagem, cultivadas na presença de O_3 , apresentavam um conteúdo diminuído de carotenóides, com diminuição na porcentagem de astaxantina e aumento na de β -caroteno e equinenona.

SANTOPIETRO et al. (1998, p. 173-176) estudaram os efeitos de radicais livres na biossíntese de pigmentos pela levedura e na sobrevivência das células. Utilizaram uma mistura de peróxido de hidrogênio e Fe^{2+} , capaz de gerar radicais livres. Verificaram que a adição de peróxido de hidrogênio (máximo 1 mmol/l) e Fe^{2+} (450 e 900 $\mu\text{mol/l}$) aumentava a concentração de carotenóides na cepa selvagem estudada. Mutantes da levedura *P. rhodozyma* produtoras apenas de β -caroteno (mutante 5-7) e mutantes não produtoras de carotenóides (mutante 3-4) também foram estudadas quanto à sobrevivência neste sistema. Verificou-se que a mutante 5-7 e a cepa selvagem não eram afetadas significativamente em 1h após a exposição, enquanto que a mutante 3-4 apresentava uma mortalidade de 36% das células. A presença destes radicais inibiu o crescimento da cepa selvagem e da mutante 5-7, porém não matou as células. Ao contrário, o sistema inibiu o crescimento da mutante que não sintetiza pigmentos e matou em torno de 1/3 das células. Isto indica que as cepas capazes de produzir carotenóides podem se manter em um ecossistema onde a concentração de radicais livres é elevada, ao contrário de cepas incapazes de produzir esta ferramenta de proteção.

Alguns outros fatores também demonstram influência no crescimento e carotenogênese da levedura *P. rhodozyma*.

A utilização de precursores de carotenóides no meio de cultivo pode estimular a produção de astaxantina. Altas taxas de astaxantina foram obtidas utilizando resíduos de tomate, indicando que alguns precursores de carotenóides podem entrar na célula e aumentar a produção de carotenóides (JOHNSON; LEWIS, 1979, p. 183).

AN (2001, p. 1005-1009) estudou os efeitos de intermediários do ciclo do ácido cítrico (CAC) e seus aminoácidos derivados no crescimento e carotenogênese da levedura *P. rhodozyma*. O suprimento de aminoácidos derivados de intermediários do CAC (glutamato, glutamina, aspartato, asparagina e prolina) promoveu um aumento no crescimento (2 g/l para 2,9-4,7 g/l) e diminuição na produção de carotenóides (de 420 µg/g biomassa para 200-260 µg/g biomassa). Quanto maior o crescimento, menor a carotenogênese. O estudo de outros aminoácidos não promoveu mudanças significativas no crescimento e produção de carotenóides. Como a adição de aminoácidos derivados do CAC aumentou o crescimento e diminuiu a carotenogênese, acredita-se que a levedura apresente uma deficiência na aminação dos intermediários do ciclo do ácido cítrico. Este resultado é comprovado pelo fato de que cepas hiperprodutoras de astaxantina apresentam uma dificuldade em assimilar nitrogênio. Uma elevada taxa respiratória e alta atividade do CAC está associada com a produção de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio. SCHROEDER e JOHNSON (1993, p. 907-912) verificaram que espécies reativas de oxigênio aumentam a produção de carotenóides na levedura *P. rhodozyma*. Além disso, a transferência de nitrogênio requer energia e este processo induz a formação de espécies reativas de oxigênio. O suprimento de aminoácidos derivados do CAC diminui a atividade do ciclo, a produção de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, a produção dos carotenóides. A adição dos intermediários do CAC também promoveu uma diminuição na carotenogênese, porém em menores proporções. Em função da adição de catabólitos relacionados ao ciclo estimularem o crescimento, acredita-se que a cepa selvagem estudada (67-385) e a mutante 2A2N apresentem um defeito mitocondrial. Para produzir astaxantina em grande escala, a produção de biomassa deve ser maximizada. Entretanto, um aumento na produção de biomassa é geralmente acompanhado por um decréscimo na produção de carotenóides. Como a utilização de intermediários do CAC promoveu um aumento na biomassa (de 2,2

g/l para 4-5,0 g/l) e uma baixa diminuição na carotenogênese (de 400 µg/g biomassa para 350-380 µg/g biomassa), a adição de componentes do meio com alto conteúdo destes intermediários, como suco de uva, podem ser interessantes em processos industriais.

GU, AN e JOHNSON (1997, p. 114-117) verificaram que o etanol era capaz de promover um aumento na produtividade de astaxantina pela levedura *P. rhodozyma*, especialmente em mutantes hiperprodutoras com alterações no metabolismo respiratório, sem promover diminuição no crescimento. A formação de carotenóides não foi afetada pelo momento da adição do etanol, indicando que o etanol afeta a produção de carotenóides durante o início da fase estacionária. A atividade de algumas enzimas, relacionadas com a carotenogênese e metabolismo do álcool, foi analisada. A atividade da NAD⁺-álcool desidrogenase foi levemente aumentada, enquanto que a atividade da hidroximetil glutaril-CoA redutase, uma enzima chave na produção de carotenóides e isoprenóides, também foi aumentada em torno de três vezes. Acredita-se que o etanol promova um aumento no fluxo pela via dos isoprenóides, através da desregulação do *feedback* realizado por esta enzima. A atividade de enzimas relacionadas ao CAC não foi significativamente alterada. A produção aumentada de carotenóides está provavelmente relacionada com uma alteração no metabolismo respiratório e formação de espécies reativas de oxigênio. Ainda, é possível que o etanol induza enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo e formação de acetil-CoA. Verificou-se uma queda no pH das culturas alimentadas com etanol. Esta diminuição pode ser devido à formação de acetaldeído e subsequente formação de acetato.

MEYER e DU PREEZ (1993, p. 919-924) estudaram a influência de ácido acético no crescimento da levedura *P. rhodozyma*. O ácido acético é um precursor da acetil-CoA, por isso acreditava-se que poderia aumentar a produtividade da astaxantina. Verificaram que a utilização de ácido acético no controle de pH após a fase exponencial promovia um aumento na produtividade de astaxantina e biomassa, quando comparado com controle utilizando ácido sulfúrico, obtendo-se um conteúdo celular de astaxantina de 1430 µg/g biomassa. Isto indica que o ácido acético é utilizado no crescimento, manutenção celular e produção de astaxantina nesta fase.

MEYER, DU PREEZ e VANDYK (1994, p. 125-128) estudaram o efeito de monoterpenos na produção de astaxantina por uma mutante da levedura *P. rhodozyma*. Tanto astaxantina como monoterpenos são sintetizados pela condensação de unidades de isopreno. Verificou-se que o aumento na concentração de α -pineno, limoneno e geraniol estimulava a produção de astaxantina. Porém o geraniol apresentava uma alta toxicidade à levedura e a concentração celular de astaxantina era menor que no caso do α -pineno e limoneno, que apresentavam praticamente o mesmo efeito (1883 e 1893 μg astaxantina/g biomassa). Na presença de piperitona e linalol a concentração celular diminuía com o aumento na concentração destes monoterpenos.

CALO et al. (1995, p. 575-578) estudaram o efeito do ácido mevalônico na produção de carotenóides pela levedura *P. rhodozyma*. Verificaram que a adição de ácido mevalônico aumentava o conteúdo celular de astaxantina em torno de 400%, obtendo-se 758,2 $\mu\text{g/g}$ biomassa em cepas selvagens desta levedura.

FONTANA et al. (1997, p.309-310) estudaram o efeito da adição de níquel como cofator para urease. A adição de níquel promoveu uma diminuição no crescimento e aumento na produtividade de astaxantina, porém não apresentou efeito na liberação e assimilação do íon amônio derivado da uréia.

AN et al. (2001, p. 204-207) estudaram o efeito dos íons metálicos Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{3+} na carotenogênese da levedura *P. rhodozyma*, uma vez que estes estão relacionados com a remoção de espécies reativas de oxigênio. Verificaram que Fe^{3+} e Mn^{2+} diminuía a produção de carotenóides pela levedura, enquanto que Zn^{2+} e Cu^{2+} , considerados menos eficientes na remoção destas espécies reativas, não afetaram a carotenogênese. Verificaram também que concentrações de cloreto férrico inferiores a 0,1 mg/l e superiores a 1 mg/l diminuía a concentração celular de astaxantina. A concentração de cloreto férrico entre 0,1-1 mg/l era recomendada para a produção de astaxantina. O Mn^{2+} interferiu na carotenogênese quando succinato foi utilizado como fonte de carbono, o mesmo não acontecendo em cultivos realizados com glucose.

FLORES-COTERA e SÁNCHEZ (2001, p. 793-797) estudaram a influência de Cu^{2+} e Fe^{2+} no crescimento e carotenogênese da levedura *P. rhodozyma*. Em concentrações inferiores a 3,2 μM , cobre aumentava a concentração celular de

astaxantina (220 para 287 µg/g biomassa), com uma ligeira diminuição no crescimento (11,3 para 10,2 g/l). Ao contrário, ferro em concentrações inferiores a 1 µM diminuía o crescimento e a carotenogênese. O cobre está relacionado com enzimas da cadeia respiratória principal. A deficiência de cobre diminui a atividade destas enzimas e, conseqüentemente, da cadeia respiratória, ativando vias alternativas que levam ao aumento da carotenogênese. A deficiência de cobre também pode diminuir a atividade de enzimas como a Cu/Zn-SOD, aumentando o estresse oxidativo e estimulando a síntese de astaxantina. Em concentrações superiores a 3,2 µM até 32 µM, o cobre não apresentou efeito. O ferro, em concentrações superiores a 2 µM até 108 µM, é necessário ao crescimento e carotenogênese.

3.2.5 Otimização da Produção

A otimização na produção de astaxantina e biomassa pela levedura *P. rhodozyma* vem sendo realizada através da obtenção e utilização de mutantes hiperprodutoras de astaxantina, estudo das condições de cultivo (incluindo meio, aeração e agitação), utilização de matérias-primas de baixo custo, estudo na forma de condução ou operação do bioprocessamento e ensaios em escala piloto para subsidiar o escalonamento do mesmo. Todas estas alternativas visam o aumento da produtividade de astaxantina e biomassa pela levedura *P. rhodozyma*, diminuindo os custos de produção e viabilizando seu cultivo em escala industrial.

3.2.5.1 Melhoramento de cepas

O melhoramento de cepas é uma ferramenta importante na diminuição dos custos de produção, através da obtenção de cepas capazes de sintetizar uma maior quantidade de um determinado produto utilizando a mesma quantidade de matérias-primas, ou seja, aumentando a produtividade da cultura e do processo (PAREKH; VINCI; STROBEL, 2000, p. 288).

Atualmente, a produção industrial de astaxantina pela levedura *P. rhodozyma* é limitada pela baixa temperatura de fermentação e também pela

ausência de cepas estáveis hiperprodutoras de astaxantina. As melhores cepas selvagens produzem em torno de 500 µg de carotenóides por grama de biomassa. Desta forma, o melhoramento da cepa é necessário para aumentar o conteúdo de astaxantina e, se possível, uma maior tolerância em relação à temperatura ótima de crescimento (JOHNSON; AN, 1991, p. 314-315).

As mutantes da levedura *P. rhodozyma* apresentam uma maior pigmentação, entretanto podem apresentar um baixo crescimento, instabilidade genética e acúmulo de precursores de astaxantina ou subprodutos desta via (SCHROEDER et al., 1996, p. 2924).

O melhoramento genético destas cepas pode ser realizado de três maneiras diferentes: mutagênese, recombinação de mutantes (por exemplo, fusão de protoplastos) e clonagem e amplificação de genes. Cada uma delas apresenta vantagens e desvantagens. Mutagênese é freqüentemente utilizada em função da sua simplicidade e não é necessário que se tenha conhecimento da biossíntese e regulação gênica do produto desejado. O sucesso deste método depende da eficiência da mutagênese e de um *screening* adequado, normalmente por exame visual, o que não permite a determinação da estabilidade das cepas. A recombinação por fusão de protoplastos pode ser utilizada com leveduras assexuadas se mais de duas linhagens diferentes das cepas estão disponíveis. Diferentes cepas selvagens da levedura *P. rhodozyma* apresentam diferentes concentrações e composição de carotenóides. Esferoplastos podem ser prontamente obtidos da levedura *P. rhodozyma* e, por fusão de esferoplastos, é possível de se desenvolver cepas com elevado conteúdo de carotenóides. A clonagem e superexpressão de genes relacionados à codificação de enzimas da via de produção de astaxantina podem ser uma alternativa, mas é difícil uma vez que diversos genes estão envolvidos na biossíntese, além de que a sua regulação gênica é desconhecida. Esta alternativa pode se tornar mais atrativa com a elucidação da via biossintética da astaxantina, suas enzimas e precursores, permitindo, então, a superexpressão de produtos específicos (JOHNSON; AN, 1991, p. 315).

A modificação e melhoramento da cepa por mutação é normalmente realizada submetendo o material genético (*in vivo* ou *in vitro*) a uma variedade de agentes físicos e químicos chamados mutagênicos. A maioria causa algum dano ao

DNA por deleção, adição, transversão ou substituição de bases, ou quebra na fita de DNA. Nitrosoguanidina é um dos agentes de escolha, em função da sua multiplicidade na mutação e porque oferece a maior frequência possível de mutantes por sobreviventes. Alteração no DNA também pode ser realizada por recombinação genética (PAREKH; VINCI; STROBEL, 2000, p. 289).

O *screening* de mutantes pode ser realizado de quatro maneiras diferentes: visualmente, *screening* negativo, positivo e por citometria de fluxo. O *screening* visual apresenta uso limitado e normalmente não é capaz de detectar mutantes, uma vez que a taxa de mutação é baixa e a diferença entre o conteúdo de carotenóides entre a mutante e a cepa selvagem é normalmente pequena. O *screening* negativo é realizado submetendo as cepas obtidas a certos estresses ambientais, uma vez que as mutantes são geralmente mais susceptíveis do que as cepas selvagens a fatores ambientais. O *screening* positivo é realizado quando compostos inibidores da carotenogênese também inibem o crescimento, permitindo o crescimento de colônias resistentes aos inibidores e, conseqüentemente, com maior conteúdo de carotenóides. É muito menos trabalhoso do que o *screening* negativo. A citometria de fluxo e *cell sorting* baseia-se na identificação de mutantes pela variação na autofluorescência (JOHNSON; AN, 1991, p. 316-317).]

AN, SCHUMAN e JOHNSON (1989, p. 116-124) estudaram o efeito da mutagênese na obtenção de cepas hiperprodutoras de astaxantina. Como agentes mutagênicos, utilizaram luz ultravioleta, etilmetanosulfonato e nitrosoguanidina. Estes autores verificaram que a nitrosoguanidina era o melhor agente utilizado, uma vez que o tratamento com luz ultravioleta resultava em mutantes com baixo conteúdo de astaxantina, e o tratamento com etilmetanosulfonato gerava mutantes com elevada frequência de reversão. As mutantes foram obtidas a partir da cepa selvagem 67-385, com uma concentração celular de astaxantina em torno de 300-450 µg/g biomassa. As melhores mutantes obtidas foram a ant-1 e ant-1-4, com 800-900 e 900-1300 µg astaxantina/g biomassa, respectivamente. Mutações sucessivas da ant-1-4 foram capazes de originar mutantes com uma concentração de astaxantina maior que 2000 µg/g biomassa. A mutante ant-1-4 foi obtida de uma mutação sucessiva da ant-1. A seleção das mutantes foi realizada com antimicina, substância inibidora da cadeia respiratória entre o citocromo b e c₁. Desta forma, as mutantes isoladas provavelmente apresentam uma alteração na cadeia respiratória,

levando à utilização de uma via alternativa que promova uma maior carotenogênese. Verificaram que o crescimento celular nas mutantes era reduzido, indicando que as mutantes não eram capazes de obter energia suficiente a partir da fonte de carbono, reforçando uma alteração na cadeia respiratória. A utilização de nitrogênio também estava comprometida nas mutantes, uma vez que o aumento na concentração da fonte de nitrogênio não aumentava a produção de biomassa. Verificaram também que as mutantes apresentavam uma concentração aumentada de DCD, produtos de degradação do HDCO e astaxantina, entretanto apresentavam uma concentração diminuída de fenicoxantina, equinenona, 3-hidroxi equinenona e β -caroteno, indicando que as mutantes apresentavam uma maior capacidade de oxigenação e desidrogenação de precursores de carotenóides. A mutante ant-1-4 era capaz de produzir cis-astaxantina.

MEYER, DU PREEZ e KILIAN (1993, p. 514-520) utilizaram nitrosoguanidina como agente mutagênico na obtenção de cepas hiperprodutoras de astaxantina, e β -ionona na seleção das mesmas. Comparada com a cepa selvagem CBS 5905T (287 μg astaxantina/g biomassa), obtiveram mutantes com conteúdo aumentado de astaxantina. Dentre elas, a mutante J4-3 com 1392 μg astaxantina/g biomassa (1688 μg carotenóides/g biomassa) e a mutante N9, obtida por mutação sucessiva, com 1834 μg astaxantina/g biomassa (2289 μg carotenóides/g biomassa). Verificavam que quando a cepa era submetida a sucessivas mutações, o conteúdo de astaxantina aumentava mas a produtividade de biomassa e a taxa de crescimento específica diminuía, provavelmente em função da diminuição da disponibilidade de carbono e energia para a biossíntese celular. Verificaram que a utilização de manitol ou succinato como fonte de carbono e valina como fonte de nitrogênio aumentava o conteúdo de astaxantina, mas também diminuía a produtividade de biomassa e a taxa de crescimento específico.

FANG e CHENG (1993, p. 466-469) realizaram mutagênese da levedura *P. rhodozyma* utilizando nitrosoguanidina como agente mutagênico e β -ionona na seleção de mutantes hiperprodutoras de astaxantina. Obtiveram a mutante NCHU-FS301 depois de repetidos tratamentos com o agente mutagênico, com uma concentração celular de astaxantina de 1516 $\mu\text{g/g}$ biomassa. Verificaram que a melhor temperatura de cultivo era de 15 °C e pH 5. Também verificaram que a

frutose promovia um aumento na biomassa (4,925 g/l) e rafinose promovia um aumento na concentração celular de astaxantina (1883,3 µg/g biomassa). Peptona foi a fonte de nitrogênio que promoveu a maior pigmentação, dentre as fontes testadas.

BON, LEATHERS e JAYASWAL (1997, p. 109-112) isolaram mutantes da levedura *P. rhodozyma* NRRL Y-17269 capazes de produzir elevada quantidade de astaxantina quando cultivadas em vinhotode destilação do etanol produzido a partir do milho. A mutante isolada, JB2, apresentou uma concentração celular de astaxantina em torno de 2,01 mg/g biomassa, quando cultivada em biorreatores.

CHUN et al. (1992, p. 221-226) utilizaram a fusão de protoplastos na obtenção de híbridos hiperprodutores de astaxantina a partir de mutantes autotróficas com um conteúdo celular de carotenóides em torno de 1600 µg/g biomassa. Obtiveram mutantes com uma concentração celular de carotenóides maior que 2000 µg/g biomassa (2280 µg/g biomassa, em condições ótimas).

3.2.5.2 Utilização de matérias-primas de baixo custo

Para tornar a produção de astaxantina viável em processos industriais, a utilização de matérias-primas de baixo custo, capaz de ser metabolizada pela levedura e estimular a síntese de pigmentos pode ser uma alternativa, assim como a obtenção de mutantes hiperprodutoras (RAMÍREZ; NUÑEZ; VALDIVIA, 2000, p. 187).

OKAGBUE e LEWIS (1984b, p. 33-39) cultivaram a levedura *P. rhodozyma* em meio contendo caldo residual de alfafa. Este caldo é obtido como resíduo na extração de proteínas das folhas da alfafa. Verificaram que sua utilização suportava um bom crescimento mas inibia a produção de astaxantina. Também verificaram um aumento na susceptibilidade da levedura à autólise, provavelmente em função da maior concentração de material protéico no caldo. A presença de proteínas no meio de cultivo predispõe a levedura à autólise. Desta forma, a utilização deste meio pode ser utilizada apenas na produção de *single cell protein*.

HAARD (1988, p. 609-614) utilizou melaço grau B e C na produção de astaxantina pela levedura *P. rhodozyma*. Verificou que a síntese de astaxantina não era inibida pela alta concentração de açúcares.

MARTIN et al. (1992, p. 235-241) estudaram a utilização de hidrolisados de turfa como principal substrato para a levedura *P. rhodozyma* 24202. Uma vez que a turfa é composta por materiais celulósicos, sua hidrólise libera celobiose. Além disso, a turfa é composta por aproximadamente 2,6% de precursores de astaxantina, como carotenos e xantofilas, presentes no betume. Dentre os parâmetros estudados, verificaram um conteúdo celular máximo de astaxantina de 1279,82 µg/g biomassa. Posteriormente, MARTIN, ACHEAMPONG e PATEL (1993, p. 223-230) otimizaram outros parâmetros como hidrólise da turfa, concentração inicial de substrato, pH inicial, temperatura de incubação, tempo de cultivo e agitação, obtendo uma concentração celular de astaxantina de 1567 µg/g biomassa. Em processos contínuos, VÁZQUEZ e MARTIN (1988, p. 314-320) obtiveram uma produção de astaxantina de 544 µg/g biomassa, utilizando hidrolisados de turfa como substrato, em processos otimizados por *design* fatorial e metodologia de superfície de resposta.

MEYER e DU PREEZ (1994a, p. 178-183) estudaram a utilização de suco de uva no crescimento e produção de astaxantina por uma cepa mutante da levedura *P. rhodozyma*. Em fermentadores de 2 l, obtiveram uma concentração celular de astaxantina de 1350 µg/g biomassa, um rendimento em astaxantina de 7,80 mg/l e um rendimento em biomassa de 5,78 g/l. Verificaram também uma preferência da levedura por glucose, quando comparada com frutose.

ACHEAMPONG e MARTIN (1995, p. 147-155) estudaram a utilização de hidrolisados de turfa em processos descontínuos, em fermentadores de 2 l. O $\mu_{\text{máx}}$ foi de 0,038, durante a fase log (30-50h). O tempo de duplicação foi de 18,24h. A maior biomassa obtida foi 4,86 g/l, em 120h de cultivo. Obtiveram uma concentração celular de astaxantina de 1086 µg/g biomassa e um rendimento em astaxantina de 5,28 mg/l. Verificou-se que a produção de astaxantina iniciava na fase log e continuava durante a fase estacionária. Desta forma, estava associada ao crescimento.

HAYMAN, MANNARELLI e LEATHERS (1995, p. 389-395) utilizaram resíduos da moenda de milho, também utilizados na produção de etanol, para a produção de astaxantina pela levedura *P. rhodozyma*. Utilizando 6 co-produtos, obtiveram, entre eles, uma concentração celular de astaxantina de 300 µg/g

biomassa e 2,4 mg/l, e uma biomassa de 7,6 g/l. Além disso, conseguiram baixar os custos da produção de \$385,00/g carotenóides, utilizando meio YM no cultivo, para \$0,67 e 0,73/g carotenóides, utilizando duas de suas melhores matérias-primas.

FONTANA et al. (1996b, p. 413-22) utilizaram um meio simplificado contendo fontes de nutrientes de baixo custo, como caldo de cana diluído, uréia e fosfato de sódio. O caldo de cana foi utilizado como fonte de carbono em função do elevado conteúdo de sacarose. A adição do fosfato de sódio tinha o objetivo de controlar o pH, que variava em função da hidrólise da uréia, mas também funcionou como suplemento, promovendo aumento no crescimento e na produtividade de astaxantina. Como referência, a utilização de proteose/peptona resultou em uma concentração celular de astaxantina maior, porém a biomassa foi reduzida. Os mesmos resultados foram obtidos em fermentadores de 2,5 l. Uma análise final na composição dos carotenóides indicou que a astaxantina correspondia a 63% do total. Desta forma, a utilização de caldo de cana e uréia, suplementada com fosfato de sódio, aparece como uma alternativa de baixo custo na produção de astaxantina.

FONTANA et al. (1996a, p. 121-125) estudaram a influência de diversas fontes de carbono e nitrogênio no crescimento e carotenogênese pela levedura *P. rhodozyma*. Os resultados obtidos utilizando caldo de cana, uréia e fosfato de sódio, como controle, são semelhantes aos descritos anteriormente (FONTANA et al., 1996b, p. 413-422). Variando a fonte de nitrogênio, verificou que a adição de aminoácidos glicogênicos, intermediários de succinato, intermediários do cetoglutarato e componentes da proteose/peptona promoviam um aumento na concentração celular de astaxantina, porém com diminuição na biomassa. A utilização de fontes de nitrogênio alternativas como farelo de soja, farelo de soja hidrolisado, couro de gado proteolizado e couro de gado sem proteolisação, também aumentaram a concentração celular de astaxantina. A utilização de outras fontes de carbono como açúcar mascavo, bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado e fécula de batata também foram estudados. A concentração celular de carotenóides utilizando açúcar mascavo como fonte de carbono foi maior do que com caldo de cana diluído.

FONTANA et al. (1997, p. 305-314) e BONFIM (1999, p. 91-108) estudaram a utilização de milhocina e vinhaça, como fonte de nitrogênio, na produção de astaxantina pela levedura *P. rhodozyma*, utilizando caldo de cana-de-açúcar como fonte de carbono. A vinhaça é um efluente de destilarias com alto conteúdo de ácido

mevalônico, precursor na biossíntese de isoprenóides. Verificaram que o milhocina produzia um aumento na produção de biomassa, mas a concentração celular de astaxantina era semelhante quando se usava uréia como fonte de nitrogênio. Entretanto, quando se utilizou vinhaça, a concentração aumentou, porém sem aumento significativo na produção de biomassa. Em meio contendo caldo e cana suplementado com uréia, obteve-se uma concentração celular de astaxantina em torno de 310 $\mu\text{g/g}$ biomassa, enquanto que utilizando caldo de cana suplementado com vinhaça obteve uma concentração celular de astaxantina em torno de 419 $\mu\text{g/g}$ biomassa.

PARAJÓ et al. (1997, p. 347-355) estudaram o crescimento e produção de carotenóides pela levedura *P. rhodozyma*, cultivada em hidrolisados enzimáticos de pinho (*Pinus pinaster*). O material foi submetido à hidrólise prévia com ácido sulfúrico e subsequente hidrólise enzimática (celulases e celobiasas), promovendo a remoção da fração hemicelulósica e despolimerização da celulose, respectivamente. Obteve-se uma taxa de crescimento específico máximo de 0,07 h^{-1} , 50% menor do que quando realizado o cultivo em controle contendo glucose, indicando a presença de inibidores no hidrolisado. O fator de conversão de substrato em biomassa foi de 0,47 g/g açúcar utilizado e o rendimento em biomassa de 7,05 g/l , enquanto que o rendimento total de carotenóides foi de 1,8 mg/l (255 $\mu\text{g/g}$ biomassa), dos quais 40-60% eram astaxantina, de acordo com o tempo de cultivo.

Em seguida, CRUZ e PARAJÓ (1998, p. 479-484) cultivaram a levedura *P. rhodozyma* em meio contendo hidrolisados de eucalipto, submetido a tratamento prévio alcalino e subsequente tratamento enzimático, utilizando celulases ou uma mistura de celulases e β -glucosidases. O tratamento com celulases fornece uma mistura de glucose e celobiose, enquanto que o tratamento com β -glucosidases e celulases fornece apenas glucose. O meio foi suplementado com nitrato de potássio e realizado um controle com meio sintético. Comparando com o meio sintético, obteve-se um aumento no fator de conversão de substrato em biomassa e uma diminuição no tempo de cultivo necessário para se obter a concentração máxima de carotenóides. Os meios contendo celobiose demonstraram um aumento na concentração de carotenóides e na porcentagem de astaxantina. O meio contendo hidrolisado com celobiose suplementado de nitrato de potássio foi o que apresentou

melhores resultados (2,14 mg carotenóides/l, 10 g/l de biomassa, 214 µg carotenóides/g biomassa, dos quais 81,5% era astaxantina).

PARAJÓ, SANTOS e VÁZQUEZ (1998b, p. 501-506) estudaram o crescimento e produção de astaxantina pela cepa selvagem NRRL Y-17268, utilizando a fração hemicelulósica hidrolisada de *Eucalyptus globulus*. Esta fração hidrolisada apresenta elevado conteúdo de xilose, prontamente hidrolisável pela levedura. Utilizando processos do tipo descontínuo, obtiveram um rendimento máximo de astaxantina de 504 µg/g biomassa (9,6 mg/l) e biomassa de 16,08 g/l, utilizando uma concentração inicial de xilose de 29 g/l. Entretanto, quando esta concentração inicial foi aumentada para 40,8 g/l, a produção de biomassa aumentou para 23,02 g/l, assim como o rendimento em astaxantina (12,9 mg/l), porém com uma pequena redução na concentração celular de astaxantina (448 µg/g biomassa), indicando a aplicabilidade deste tipo de substrato na produção de astaxantina por esta levedura.

RAMÍREZ, NUÑEZ e VALDIVIA (2000, p. 187-190) estudaram o crescimento e produção de carotenóides pela levedura *P. rhodozyma* utilizando suco de *Yucca fillifera* (tâmara) como fonte de carbono, e uréia como fonte de nitrogênio. Utilizando uma cepa mutante da cepa selvagem 24202 (25-2), obtiveram um rendimento em astaxantina de 6,43 mg/l (1,203 mg/g biomassa), ou seja, 2,5 vezes maior do que obtida em meio YM tradicional. Além disso, obtiveram um conteúdo celular de astaxantina entre 90-95% do total de carotenóides. RAMÍREZ, GUTIERREZ e GSCHAEDLER (2001, p. 259-268) otimizaram a produção de astaxantina pela levedura *P. rhodozyma*, em meio contendo suco de tâmaras, utilizando *design* fatorial e metodologia de superfície de resposta, obtendo um rendimento em astaxantina de 8,1 mg/ml, com a mutante hiperprodutora 25-2.

Outros autores, como AN, JANG e CHO (2001, p. 121-125), VÁZQUEZ, SANTOS e PARAJÓ (1998, p. 43-55) e CHOCIAI et al. (2002, p. 457-462) também utilizaram matérias-primas de baixo custo no cultivo da levedura *P. rhodozyma* (melaço de beterraba (*blackstrap*), hidrolisados de *Eucalyptus globulus* e caldo de cana-de-açúcar, respectivamente).

3.2.5.3 Condução de bioprocessos

Um processo fermentativo pode ser conduzido de forma descontínua, descontínua alimentada, semicontínua ou contínua.

As fermentações descontínuas clássicas, ou simplesmente fermentações descontínuas, vêm sendo utilizadas pelo homem desde a Antigüidade e, ainda hoje, são as mais empregadas para a obtenção de vários produtos fermentados. São também conhecidas por fermentação em batelada ou processo descontínuo de fermentação. Seu modo de operação pode ser descrito assim: no instante inicial a solução nutriente esterilizada no fermentador é inoculada com microorganismos e incubada, de modo a permitir que a fermentação ocorra sob condições ótimas. No decorrer do processo fermentativo nada é adicionado, exceto oxigênio (quando necessário ou quando o agente do processo desenvolver metabolismo aeróbio), antiespumante, e ácido e base para o controle do pH. Terminada a fermentação, o meio fermentado é retirado e submetido a tratamentos finais. Desta forma, se não ocorrer adição de soluções no controle do processo nem perda de líquido por evaporação, o volume no decorrer da fermentação permanece constante. Pode levar a baixos rendimentos e/ou produtividades quando o substrato adicionado de uma só vez no início do processo exerce efeitos de inibição, repressão ou desvia o metabolismo celular a produtos que não interessam (CARVALHO; SATO, 2001a, p. 193-194).

Os processos descontínuo alimentado, semicontínuos e contínuos normalmente aparecem como uma alternativa na otimização dos processos descontínuos.

Os processos descontínuo alimentado, também chamados de fermentação descontínua alimentada ou processo por batelada alimentada, é definida como uma técnica onde um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e em que os produtos aí permaneçam até o final da fermentação. Em alguns casos, os nutrientes são gradualmente alimentados, em uma vazão constante ou variável com o tempo. A adição pode ser de forma contínua ou intermitente e a variação no volume pode ou não ocorrer de acordo com a concentração do substrato adicionado e a taxa de evaporação do sistema. Estes processos são principalmente utilizados nos casos em que a concentração de substrato interfere no metabolismo

celular e na produtividade do produto desejado, e quando ocorre a formação de produtos do metabolismo que são tóxicos ao microorganismo (CARVALHO; SATO, 2001b, p. 205-210).

Estes processos podem ser classificados de diversas maneiras. Processo descontínuo alimentado repetitivo é aquele em que uma fração constante de volume de cultura é removida a intervalos de tempo fixos, podendo ser mantido indefinidamente. Em outras palavras, de tempos em tempos, retira-se rapidamente um determinado volume de meio fermentado do biorreator (que será destinado à separação do produto), sendo recomposto até seu valor máximo através da adição de mosto com vazão de alimentação conveniente. Enchimentos e esvaziamentos repetidos de volumes específicos resultam em uma operação cíclica de variação de volume, sendo conhecida também por processo descontínuo cíclico. Processo descontínuo alimentado estendido descreve o modo de operação em que a concentração de substrato limitante é mantida constante no meio de cultivo pelo suprimento contínuo do nutriente. Tem por finalidade estender o período de cultivo, mantendo níveis de concentração de substrato adequados para que as células continuem com atividade fermentativa direcionada para a formação do produto desejado (CARVALHO; SATO, 2001b, p. 210-211).

O processo descontínuo alimentado pode ser dividido em dois grupos, baseando-se no fato da alimentação ser ou não controlada por um mecanismo de retroalimentação. No controle por retroalimentação, o fornecimento de substrato pode ser controlado em função da concentração deste no meio de cultivo (controle direto) ou em função de outros parâmetros (controle indireto) tais como densidade óptica, pH, quociente respiratório, entre outros. Por outro lado, o suprimento de substrato é feito intermitentemente ou de forma ininterrupta até o final da fase de enchimento do biorreator nos processos não sujeitos ao controle por retroalimentação. A vazão pode ser constante ou variável, de forma a otimizar os valores da concentração de substrato a fim de que se aumente o rendimento e/ou produtividade do processo (CARVALHO; SATO, 2001b, p. 211-212).

Existem também os processos semicontínuos, que pode ser definido da seguinte forma: uma vez colocado no fermentador o meio de cultivo e o inóculo, aguarda-se o término do processo, retira-se parte do meio fermentado, mantendo-se no biorreator o restante do meio fermentado, e adiciona-se ao biorreator um volume

de meio de cultivo igual ao volume de meio retirado anteriormente. É chamado de semicontínuo porque são intermitentes o fluxo da entrada e saída de meio do biorreator (BORZANI, 2001, p. 219).

O processo contínuo caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua de meio de cultura a uma determinada vazão constante, sendo o volume de reação mantido constante através da retirada contínua de meio fermentado. Caracteriza-se por ser um sistema que pode operar por longos períodos de tempo em estado estacionário, podendo aumentar a produtividade do processo (FACCIOTTI, 2001, p. 223-224).

O cultivo da levedura *P. rhodozyma* em processos descontínuos apresenta o problema da inibição de elevadas concentrações de açúcares totais no crescimento e na produção de carotenóides, fenômeno chamado de efeito Crabtree. Em processos contínuos, os baixos rendimentos em função do baixo $\mu_{\text{máx}}$ ($0,12 \text{ h}^{-1}$), acúmulo de glucose residual em taxas de diluição acima de $0,07 \text{ h}^{-1}$ e o baixo conteúdo de astaxantina, tornam inviável o cultivo desta levedura neste sistema (MEYER; DU PREEZ, 1994b, p. 780-785). Uma alternativa pode ser o cultivo em processos descontínuo alimentado, permitindo que a concentração de substrato seja mantida baixa no meio de cultivo, superando a fermentação aeróbia em elevadas concentrações de açúcar e evitando o efeito Crabtree (REYNDERS; RAWLINGS; HARRISON, 1996, p. 649).

YAMANE et al. (1997a, p. 1109-1111) realizaram o cultivo da levedura *P. rhodozyma* em processos descontínuo alimentado em dois estágios. No primeiro, era realizada a alimentação com solução de glucose com controle pH-stat (alimentação de substrato em resposta à mudança do pH na cultura), a fim aumentar a densidade celular. No segundo estágio, era realizada a alimentação com etanol com controle de DO-stat (alimentação de substrato em resposta à variação na concentração de oxigênio dissolvido na cultura), a fim de aumentar a produtividade de astaxantina. A cepa utilizada foi a ATCC 24202, em fermentadores de 5 l. Foi obtida uma biomassa de 30 g/l e um conteúdo celular de astaxantina de 0,72 mg/g biomassa (21,6 mg/l), 2,2 vezes maior do que realizando apenas a alimentação com glucose.

SANTOPIETRO, SPENCER e SIÑERIS (1998, p. 171-172) estudaram a utilização de processos descontínuo alimentado no cultivo da levedura *P.*

rhodozyma, utilizando um sistema que calcula a taxa de crescimento específico no cultivo, através de um turbidímetro, e controla o suprimento de glucose, através de uma bomba peristáltica, mantendo uma taxa de crescimento específico preestabelecida. Desta forma, mantendo a taxa de crescimento específico em 0,05 h⁻¹ e 0,10 h⁻¹, obteve-se uma produção de carotenóides de 628 e 566 µg/g biomassa, respectivamente, maior do que a obtida em processos descontínuos (375 µg/g biomassa). Nestes processos, consegue-se evitar o efeito negativo da glucose, manter a produção de biomassa e aumentar a produtividade dos carotenóides totais.

VÁZQUEZ, SANTOS e PARAJÓ (1998, p. 43-55) estudaram a utilização de processos descontínuo alimentado repetitivo e processos descontínuo alimentado com taxa constante de alimentação na otimização da produção de astaxantina pela levedura *P. rhodozyma*. Utilizaram hidrolisados de *Eucaliptus globulus* como substrato principal. Nas fermentações do tipo descontínuo, obtiveram uma produção de biomassa de 0,090 g/l/h e 0,54 g biomassa/g substrato, além de um conteúdo celular de astaxantina de 523 µg/g biomassa. Utilizando processos do tipo descontínuo alimentado com taxa constante de alimentação, obteve uma produtividade de biomassa de 0,020 g/l/h e 0,19 g biomassa/g substrato, com uma produção de astaxantina de 778 µg/g biomassa e 8,15 mg carotenóides/l. Em processos descontínuo alimentado repetitivo, com remoção de meio fermentado e adição de meio fresco, obteve-se um aumento na produção de astaxantina (30,5 mg/l, 0,082 mg/l/h e 996 µg/g biomassa), porém com um processo de aproximadamente 360 horas. Acredita-se que nos processos do tipo descontínuo o metabolismo dos carotenóides esteja desviado para a formação de subprodutos.

HO, TAM e ZHOU (1999, p. 175-178) estudaram o crescimento e produção de carotenóides pela levedura *P. rhodozyma* em processos descontínuo alimentado, utilizando diversos modelos de alimentação, dentre eles, taxa de alimentação constante, exponencial, DO-stat e pH-stat. Verificaram que, quando comparada com o cultivo descontínuo, a taxa de crescimento específico diminuía em todos eles, sendo mais acentuada no modelo pH-stat. A maior biomassa (17,4 g/l) foi obtida no modelo DO-stat. Entretanto, a maior produtividade de carotenóides foi obtida com alimentação exponencial (412 µg/g biomassa e 6,06 mg/l), talvez estimulado pela grande quantidade de etanol produzida nos últimos estágios da fermentação. Em

função dos baixos resultados obtidos no cultivo utilizando pH-stat, CHAN e HO (1999, p. 953-958) otimizaram o cultivo neste sistema, obtendo uma taxa de crescimento específico de $0,095\ h^{-1}$, semelhante aos resultados obtidos anteriormente.

CHOCIAI et al. (2002, p. 457-462) cultivaram a levedura *P. rhodozyma* em processos descontínuo alimentado intermitente, utilizando matérias-primas de baixo custo como caldo de cana e uréia. Obteve-se um aumento de 94% na produção de biomassa (9,12 g/l), quando comparado com processos descontínuos (4,7 g/l). Também foi verificado um aumento de 77% no rendimento em astaxantina (2,37 mg/l). A produtividade de astaxantina aumentou de 0,013 para 0,024 mg/l/h, assim como o fator de conversão de substrato em astaxantina (0,056 para 0,089 mg de astaxantina/ g substrato consumido). Entretanto, o conteúdo celular de astaxantina diminuiu de 285 para 259 $\mu\text{g/g}$ biomassa.

AN et al. (1996, p. 515-518) otimizaram as condições de crescimento para a mutante HT-5FO1C, obtida a partir de mutação da cepa selvagem 67-385. Em processos descontínuo alimentado intermitente, obtiveram uma biomassa de 44 g/l e uma concentração celular de carotenóides de 1,1 mg/g biomassa (48,4 mg/l), suplementando o meio com uréia e glucose. Entretanto, a utilização do meio otimizado, segundo os próprios autores, não é indicado no cultivo em função de seu elevado custo.

AN, JANG e CHO (2001, p. 121-125) utilizaram meio contendo melaço de beterraba (*blackstrap*), uréia e fosfato de sódio na alimentação intermitente de processos em escala piloto (70-100 l). O melaço é uma matéria-prima de baixo custo e distribuída mundialmente. Apresenta uma concentração de açúcares em torno de 50%. A cepa utilizada foi a mutante 2A2N. A concentração de oxigênio dissolvido foi mantida entre 30-40% de saturação. Taxas maiores inibiam o crescimento, enquanto que taxas menores ocasionavam a produção de etanol e diminuição na produção de carotenóides. Obteve-se uma biomassa de 36 g/l e um conteúdo celular de astaxantina de 1,1 mg/g biomassa (39,6 mg/l). Verificou-se também a produção de maltose e carboidratos de elevado peso molecular pela levedura.

Desta forma, a utilização de processo fermentativo descontínuo alimentado tem demonstrado ser uma ferramenta importante na otimização de bioprocessos,

permitindo o aumento na produtividade de biomassa e astaxantina no cultivo da levedura *P. rhodozyma*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

O material utilizado nos experimentos, assim como sua procedência, estão relacionados abaixo:

- a) caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), cultivada no município de Joinville, Santa Catarina, e obtido em uma moenda móvel na cidade de Curitiba, Paraná;
- b) microorganismo *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) ATCC 24202, adquirido da *American Type Culture Collection*, Rockville, Mariland, Estados Unidos da América;
- c) reagentes, todos de grau analítico, obtidos da Merck do Brasil, Sigma Chemicals, Dow Corning e Synth.

4.2 MÉTODOS GERAIS

Os métodos gerais utilizados nos experimentos, assim como os equipamentos utilizados, estão relacionados abaixo:

- a) espectrofotometria, em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu modelo UV-1601PC;
- b) incubação, em estufa microbiológica BOD Tecnal modelo TE-391;
- c) incubação, em incubadora com agitação orbital Marconi modelo MA 420;
- d) esterilização sob pressão, em autoclave Phoenix, modelo AV50;
- e) esterilização por vapor fluente, em autoclave Fabbe, modelo 103;
- f) liofilização, em liofilizador Labconco 4.5;
- g) pesagem, em balança analítica Marte modelo AS 2000;
- h) microscopia, em microscópio óptico Metrimpex/PZO-Labmex modelo STUDAR^{lab}
- i) processos fermentativos, em biorreator B. Braun Biotech International modelo Biostat B, com volume nominal de 2 l;
- j) centrifugação, em centrífuga Janetzki modelo T23.

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Doseamento de Açúcares Totais

O doseamento de açúcares totais foi realizado pelo método do fenol-sulfúrico, descrito por DUBOIS et al. (1956, p. 351-356).

4.3.2 Determinação da Biomassa

A avaliação da biomassa foi realizada tanto pelo método gravimétrico como turbidimétrico.

O método gravimétrico foi utilizado na determinação da concentração celular (biomassa) no final do processo, após o término da fermentação. Pelo método gravimétrico, a avaliação da biomassa foi realizada pela centrifugação das amostras (3.000 rpm/5 minutos) e, em seguida, lavagem das células e liofilização do precipitado até peso constante.

A determinação da biomassa é realizada segundo a equação (1).

$$X_a = X_t / V \quad (1)$$

Onde:

X_a = biomassa no final do processo (g/l)

X_t = peso seco (g)

V = volume da amostra (l)

O método turbidimétrico foi o método utilizado na determinação da concentração celular durante todo o processo, permitindo o acompanhamento do crescimento celular em cada intervalo de tempo. Pelo método turbidimétrico, a avaliação da concentração celular foi realizada através da diluição adequada das amostras com água destilada, seguida pela leitura em espectrofotômetro a 650 nm, de modo a obter uma leitura inferior a 0,60, onde existe uma linearidade entre a densidade ótica e a concentração celular, neste comprimento de onda (SLININGER et al., 1982, p. 371-384).

4.3.3 Doseamento de Astaxantina

A determinação da concentração celular e volumétrica de astaxantina foi realizada no final do processo, a fim de se determinar as produtividades e rendimentos do sistema em relação ao produto.

O doseamento foi realizado de acordo com o método estabelecido por BONFIM (1999, p. 77-78), como descrito abaixo:

- a) triturar a amostra, liofilizada e de massa conhecida, com bastão de vidro, obtida após a determinação da biomassa;
- b) adicionar 2 ml de dimetilsulfóxido e deixar em repouso por 30 minutos;
- c) adicionar 6 ml de acetona e homogeneizar;
- d) centrifugar a 3.500 rpm por 5 minutos;
- e) separar o sobrenadante e repetir o processo com o precipitado;
- f) juntar os sobrenadantes obtidos e adicionar 10 ml de solução de cloreto de sódio 200 g/l, 10 ml de éter de petróleo e agitar;
- g) retirar a fase etérea, adicionar mais 2 x 5 ml de éter de petróleo e agitar;
- h) juntar as fases etéreas obtidas e filtrar por sulfato de sódio anidro;
- i) transferir para balão volumétrico de 25 ml e completar o volume com éter de petróleo;
- j) medir a absorbância em 474 nm, utilizando éter de petróleo como branco.

A determinação da concentração celular de astaxantina, obtida no final do processo, é realizada utilizando-se a equação (2), sabendo-se que a absorvidade específica para xantofilas é $A^{1\%}_{1cm} = 1.600$.

$$P_y = (A \times D) / (0,16 \times X_t) = P_t / X_t \quad (2)$$

Onde:

P_y = concentração celular de astaxantina no final do processo (μg astaxantina/g biomassa)

A = absorbância

D = fator de diluição (25)

X_t = peso seco (g)

P_t = massa de astaxantina (μg)

A determinação da concentração volumétrica de astaxantina, obtida no final do processo, pode ser realizada pela equação (3).

$$P_v = (A \times D) / (0,16 \times V) = (P_t / V) \quad (3)$$

Onde:

P_v = concentração volumétrica de astaxantina no final do processo (mg/l)

A = absorbância

D = fator de diluição (25)

V = volume da amostra (ml)

P_t = massa de astaxantina (μg)

4.4 TRATAMENTO DO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O caldo de cana, após sua aquisição, foi centrifugado a 6.000 rpm, a fim de remover restos celulares da cana-de-açúcar e materiais contaminantes provenientes da moagem. Após centrifugação, uma alíquota homogênea foi retirada e foi realizado o doseamento de açúcares totais. Em seguida, o caldo de cana foi acondicionado (-20°C) para uso posterior.

O caldo de cana utilizado em nossos experimentos apresentava uma concentração de açúcares totais de 250 g/l.

4.5 MEIOS DE CULTIVO

Os meios de cultivo utilizados na manutenção e crescimento dos microorganismos estão descritos abaixo.

4.5.1 Meio de Manutenção

A composição do meio de cultura utilizado na manutenção e conservação da cepa é:

Sacarose	0,1g
Extrato de levedura	0,05 g
Peptona	0,05 g
Ágar	1,5 g
Água destilada	qsp 100 ml

O meio foi distribuído em tubos, esterilizado em autoclave a 120 °C/1 atm por 20 minutos, e então inclinado para solidificação.

4.5.2 Meio Pró-carotenogênico

A composição do meio pró-carotenogênico, utilizado no preparo do inóculo, é descrito abaixo:

Sacarose	2 g
Extrato de levedura	0,1 g
Peptona	0,5 g
Ágar	1,5 g
Água destilada	qsp 100 ml

O meio pró-carotenogênico pode ser preparado na forma líquida, com a ausência de ágar.

O pH do meio foi corrigido para 6,0 e, então, o meio foi esterilizado em autoclave a 120 °C/1 atm por 20 minutos.

4.5.3 Meio de Cultivo

A composição do meio utilizado nos processos é:

Caldo de cana	qsp 2 g de açúcares totais
Uréia	0,1g
Água destilada	qsp 100 ml

O meio foi esterilizado em autoclave sob vapor fluente por 40 minutos.

4.5.4 Solução Nutritiva

A composição da solução nutritiva utilizada na alimentação dos processos fermentativos do tipo descontínuo alimentado é:

Caldo de cana	qsp 10 ou 25 g de açúcares totais
Água destilada	qsp 100 ml

A solução nutritiva contendo 250 g/l de açúcares totais corresponde ao caldo de cana puro.

A solução foi esterilizada em autoclave sob vapor fluente durante 40 minutos. Após esterilização, a solução foi filtrada a vácuo por filtro qualitativo e, então, reesterilizada nas mesmas condições.

4.6 CONSERVAÇÃO DO MICROORGANISMO

O microorganismo foi cultivado no meio de manutenção, por 48h, em estufa a 24 °C e, em seguida, estocado em geladeira a 4 °C. O repique dos microorganismos foi realizado bimestralmente.

4.7 PREPARO DO INÓCULO

O microorganismo foi cultivado em meio pró-carotenogênico sólido e incubado em estufa a 24 °C por 48h. Após o período de incubação, o tubo foi lavado com água destilada estéril. Em seguida, foi realizada a leitura da turbidimetria desta suspensão a fim de se avaliar a concentração celular da mesma. Uma alíquota desta suspensão, capaz de fornecer uma densidade ótica em torno de 0,200 (650 nm), foi

adicionada em erlenmeyer contendo 50 ml de meio pró-carotenogênico líquido. Em seguida, o erlenmeyer foi incubado em agitador orbital a 150 rpm, 24 °C, durante 48h. Após incubação, retirou-se uma alíquota do meio fermentado e avaliou-se a turbidimetria obtida, assim como se verificou a pureza da cultura pela análise de material a fresco em microscópio ótico. Este meio fermentado foi utilizado como inóculo do meio de cultivo no biorreator.

4.8 CULTIVO

Os cultivos foram realizados em biorreatores de 2 l de capacidade nominal, utilizando o meio de cultivo descrito. Nos processos descontínuo alimentado, a alimentação foi realizada com as soluções nutritivas descritas. O meio de cultivo foi inoculado com o inóculo preparado como descrito anteriormente, de forma a conferir uma densidade ótica em torno de 0,200 (650 nm). As variáveis utilizadas no monitoramento do processo foram as mesmas em todos os experimentos: tempo, pH, aeração, agitação, iluminação, temperatura, amostragem, volume inicial, tipo e concentração da fonte de nitrogênio e carbono, e anti-espumante.

4.8.1 Tempo

Todos os cultivos foram realizados em 96h. BONFIM (1999, p. 108-110) estudou o efeito do tempo no crescimento e astaxantinogênese da levedura *P. rhodozyma* em processos descontínuos. Verificou que a partir de 96h de cultivo, utilizando caldo de cana na concentração de 20 g/l de açúcares totais e uréia na concentração de 1 g/l, não ocorria mais produção significativa de astaxantina nem de biomassa. Em função destes resultados, o tempo de cultivo empregado em nossos experimentos foi de 96h.

4.8.2 pH

O pH do meio de cultivo foi controlado em torno de $6 \pm 0,2$, pela adição automática de NaOH 1 M e H₂SO₄ 1 M. BONFIM (1999, p. 97-98) estudou o efeito do pH inicial no crescimento e astaxantinogênese da levedura *P. rhodozyma*, em

meio de cultivo constituído por caldo de cana e uréia como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Dentre os pH iniciais estudados, na faixa de 3 a 6,5, a influência no crescimento foi baixa, sendo que o rendimento em biomassa manteve-se praticamente constante em todos os pH estudados. Porém a variação no pH afetou significativamente a astaxantinogênese na levedura *P. rhodozyma*. O maior rendimento em astaxantina ocorreu no pH 6. Em pH superior e abaixo de 6 ocorria uma diminuição na astaxantinogênese. Em valores de pH entre 3,0 e 3,5 obteve um aumento na concentração de carotenóides, porém relacionado ao aumento na produção de β -zeacaroteno, um intermediário na biossíntese de carotenóides. Em função destes resultados, o pH em nossos experimentos foi mantido em torno de 6.

4.8.3 Aeração e Agitação

A aeração foi realizada com ar atmosférico na vazão de 1 vvm. A agitação foi controlada manualmente de forma a manter a concentração de oxigênio dissolvido no meio sempre acima de 40%. YAMANE et al. (1997b, p. 4472-4473) estudaram o efeito da concentração de oxigênio dissolvido no crescimento e produção de astaxantina. Em concentrações de oxigênio dissolvido de 0, 2, 5 e 8 mg/l (0%, 22,62%, 56,56% e 90,50% de saturação, respectivamente), verificaram que as maiores produtividades de astaxantina e biomassa eram obtidas em cultivos realizados com uma concentração de oxigênio dissolvido superior a 2,0 mg/l, indicando a necessidade de um ambiente de aerobiose para garantia dos melhores desempenhos. Em função destes resultados, a aeração e agitação foram realizadas de forma a manter a concentração acima de 40%.

4.8.4 Iluminação

Segundo AN e JOHNSON (1990, p. 191-203), em elevadas intensidades luminosas o crescimento da levedura *P. rhodozyma* era inibido e a produção de pigmentos diminuía. JOHNSON e LEWIS (1979, p. 181) verificaram que a luz não estimulava a carotenogênese. Porém, outros autores verificaram uma maior produção de astaxantina na presença de luz (VÁZQUEZ; SANTOS, 1998, p. 181-182; PARAJO; SANTOS; VÁZQUEZ, 1998b, p. 502).

Em função da maior facilidade de se garantir um ambiente escuro, todos os cultivos da levedura *P. rhodozyma* foram realizados na ausência de luz.

4.8.5 Temperatura

A temperatura dos cultivos foi controlada em $24 \pm 0,5$ °C, a mesma temperatura de escolha de BONFIM (1999, p. 67-76) em seus experimentos.

4.8.6 Amostragem

Foram realizadas amostragens de 3 ml a cada 8h.

4.8.7 Volume Inicial

Nos processos descontínuos, o volume inicial do meio de cultivo era de 1,5 l, enquanto que nos processos descontínuo alimentado o volume inicial era de 0,8 l.

4.8.8 Fonte de Nitrogênio e Concentração

A fonte de nitrogênio utilizada em nossos experimentos foi a uréia, em função de sua abundância e baixo custo.

A concentração inicial de uréia no meio de cultivo foi de 1 g/l. BONFIM (1999, p. 91-93) verificou que, dentre as concentrações estudadas (0 g/l, 0,75 g/l, 1 g/l, 1,25g/l e 1,50 g/l) a utilização de uréia na concentração de 1 g/l foi a que apresentou o maior rendimento em biomassa. Em relação ao rendimento em astaxantina, os resultados obtidos utilizando uréia na concentração de 0,75 g/l e 1 g/l não apresentaram diferença significativa. Porém, em concentrações acima de 1 g/l e na ausência de uréia, observou-se um decréscimo na produção de biomassa e na astaxantinogênese. Em função destes resultados, optou-se pela utilização de uréia na concentração de 1 g/l em nossos experimentos.

4.8.9 Fonte de Carbono e Concentração

A matéria-prima utilizada em nossos experimentos foi o caldo de cana-de-açúcar, também em função de sua abundância e baixo custo. Desta forma, a fonte de carbono utilizada foi a sacarose.

A concentração inicial de açúcares totais no meio de cultivo foi de 20 g/l. BONFIM (1999, p. 95-97) estudou o efeito da concentração do caldo de cana no crescimento e na astaxantinogênese da levedura *P. rhodozyma*. Utilizando caldo de cana nas concentrações de 20, 40, 60 e 80 g/l de açúcares totais, com ou sem suplementação de uréia na concentração de 1 g/l, verificou um maior rendimento em biomassa e astaxantina utilizando caldo de cana na concentração de 20 g/l de açúcares totais, com a suplementação de uréia. Em concentrações acima de 20 g/l, verificou uma diminuição tanto no rendimento em biomassa como no rendimento em astaxantina. Em função destes resultados, optou-se pela utilização de caldo de cana na concentração de 20 g/l de açúcares totais em nossos experimentos.

4.8.10 Anti-espumante

A adição de anti-espumante foi realizada manualmente, de acordo com a necessidade do processo. O anti-espumante utilizado foi uma emulsão a base de simeticone, da Dow Corning (*Medical Antifoam C Emulsion, 30% Simethicone*).

4.9 PROCESSOS ESTUDADOS

A produção de astaxantina e biomassa pela levedura *P. rhodozyma* foi realizada em processos descontínuo e descontínuo alimentado. Os processos descontínuo alimentado foram realizados com alimentação intermitente, contínua e também estendida, a fim de otimizar a produção de astaxantina e biomassa pela levedura, em biorreatores. Todos os experimentos foram realizados segundo os parâmetros de cultivo descritos anteriormente. Os experimentos e as análises foram realizados em duplicata. Os resultados apresentados correspondem à média aritmética obtida em cada processo.

4.9.1 Processos Descontínuos

Foram realizados experimentos utilizando a levedura *P. rhodozyma* em processos descontínuos a fim de verificar a produção de biomassa e astaxantina neste processo e substrato em biorreatores, além de obter uma referência para a otimização por processos descontínuo alimentado.

4.9.2 Processos Descontínuo Alimentado Intermitente

Foram realizados experimentos utilizando a levedura *P. rhodozyma* em processos descontínuo alimentado intermitente a fim de verificar os efeitos da alimentação intermitente na produção de biomassa e astaxantina pela levedura e buscar a otimização das produtividades e rendimentos, quando comparada com o processo descontínuo.

A alimentação, realizada com solução nutritiva na concentração de 100 g/l de açúcares totais, foi realizada em 24, 48 e 72 horas de cultivo. Nestes tempos, realizou-se a amostragem e, em seguida, determinou-se a concentração de açúcares totais presentes no meio de cultivo. Com base nestes valores, calculou-se o volume de solução nutritiva necessária para corrigir a concentração de açúcares totais do meio de cultivo para 20 g/l, utilizando a equação (4), uma vez que concentrações superiores ou inferiores podem interferir na produção de biomassa e astaxantina pela levedura (BONFIM, 1999, p. 95-97).

Sabendo-se que:

$$V_f = V_i + V_a$$

Temos:

$$V_f \times C_f = (V_i \times C_i) + (V_a \times C_a)$$

$$V_a = V_i (C_f - C_i) / (C_a - C_i)$$

$$V_a = V_i (C_i - C_f) / (C_f - C_a) \quad (4)$$

Onde:

V_i = volume de meio no biorreator antes da adição de solução nutritiva (l)

C_i = concentração de açúcares totais no biorreator antes da correção (g/l)

V_a = volume de solução nutritiva (l) a ser adicionada no biorreator, capaz de corrigir a concentração de açúcares totais para 20 g/l

C_a = concentração da solução nutritiva (g/l)

V_f = volume obtido no biorreator após a correção com solução nutritiva (l)

C_f = concentração (g/l) que se deseja obter no biorreator com a adição de solução nutritiva, ou seja, 20 g/l

O consumo de açúcares totais pelo microorganismo, em um determinado intervalo de tempo, pode ser calculado pela equação (5), segundo CARVALHO e SATO (2001b, p. 213).

$$C = dM_{sc}/dt \quad (5)$$

Onde:

$C = dM_{sc}/dt$ = taxa de consumo de açúcares totais em termos mássicos (g/h)

M_{sc} = massa de açúcares totais consumida pelo microorganismo (g)

t = tempo (h)

4.9.3 Processos Descontínuo Alimentado com Alimentação Contínua

Foram realizados experimentos utilizando a levedura *P. rhodozyma* em processos descontínuo alimentado com alimentação contínua, a fim de verificar a influência deste tipo de processo na produção de biomassa e astaxantina e otimizar as produtividades e rendimentos do processo, quando comparado com processos descontínuo alimentado intermitente e descontínuo. A taxa de alimentação, em cada intervalo do processo, foi obtida a partir das taxas de consumo de açúcares do processo descontínuo alimentado intermitente, através da equação (5). A equação (5) fornece o consumo de açúcares totais pelo microorganismo em cada intervalo de tempo. Desta forma, foram adicionados volumes de solução nutritiva capazes de satisfazer as necessidades de consumo do microorganismo em cada intervalo de tempo. A alimentação foi realizada de forma contínua, utilizando a solução nutritiva na concentração de 100 g/l de açúcares totais. A alimentação foi realizada entre 16 e 72h de cultivo.

4.9.4 Processos Descontínuo Alimentado Estendido

Foram realizados experimentos utilizando a levedura *P. rhodozyma* em processos descontínuo alimentado estendido, a fim de verificar a influência deste tipo de processo na produção de biomassa e astaxantina, além de otimizar e maximizar os rendimentos e produtividades obtidos nos processos anteriores. Nos experimentos, buscou-se manter a concentração de açúcares totais no meio de cultivo em torno de 20 g/l, durante o período de alimentação, a fim de se evitar a diminuição no rendimento em biomassa e astaxantina observada por BONFIM (1999, p. 95-97), em concentrações acima de 20 g/l de açúcares totais no meio de cultivo.

A alimentação foi realizada de forma contínua, utilizando solução nutritiva na concentração de 100 e 250 g/l. Inicialmente, a taxa de alimentação, em cada intervalo do processo, foi obtida a partir das taxas de consumo de açúcares totais dos processos descontínuo com alimentação contínua, através da equação (5). A partir de então, as taxas de alimentação eram obtidas a partir do processo estendido precedente ao experimento.

Sabendo-se que a quantidade de açúcares totais presente em um determinado volume adicionado será igual a quantidade consumida pelo microorganismo em um determinado intervalo de tempo, o volume adicionado promoverá uma diluição no meio de cultivo, calculado pela equação (6).

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$C_2 = (C_1 \times V_1) / V_2 \quad (6)$$

Onde:

C_1 = concentração de açúcares totais no meio de cultivo (g/l)

V_1 = volume de meio de cultivo no biorreator (l)

V_2 = volume de meio de cultivo mais volume de solução nutritiva adicionada (l)

C_2 = concentração no meio de cultivo após a adição da solução nutritiva (g/l), considerando que todo o açúcares totais adicionado foi consumido.

Sabendo-se da diluição teórica causada, é possível determinar o volume de solução nutritiva adicional que deve ser adicionado ao meio de cultivo a fim de que a concentração de açúcares totais no mesmo seja mantida em torno de 20 g/l durante o intervalo de alimentação. Este volume adicional é determinado pela equação (4), considerando que $V_1 = V_2$ e $C_1 = C_2$. Desta forma, a taxa de alimentação é calculada de forma a satisfazer as necessidades de consumo de açúcares totais do microorganismo em cada intervalo de tempo (C), assim como corrigir a diluição causada no meio de cultivo pela adição da solução nutritiva, mantendo-se a concentração desejada no meio de cultivo.

A alimentação foi realizada entre 16 e 72h, com solução nutritiva na concentração de 100 g/l de açúcares totais, e entre 24 e 72h, com solução nutritiva na concentração de 250 g/l de açúcares totais. O início da alimentação foi determinado pela capacidade da bomba peristáltica do biorreator. Com a solução nutritiva na concentração de 250 g/l de açúcares totais, a adição não pôde ser iniciada em 16h de cultivo pois o volume de solução a ser adicionado era menor do que o mínimo capaz de ser adicionado pela bomba.

4.10 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos nos experimentos podem ser expressos de diversas formas, permitindo uma melhor visualização e compreensão do processo fermentativo. Os resultados obtidos em nossos experimentos serão expressos e analisados na forma de rendimentos, produtividades e fatores de conversão do processo, calculados segundo as equações (7) a (13).

4.10.1 Produtividade em Biomassa

A produtividade do processo em relação à biomassa pode ser obtida pela equação (7), segundo HISS (2001, p. 96).

$$P_x = (X - X_o) / t_f \quad (7)$$

Onde:

P_x = produtividade em biomassa (g/l/h)

X = biomassa no final do processo, ou seja, rendimento em biomassa (g/l)

X_o = biomassa no início do processo (g/l)

t_r = tempo de cultivo, ou seja, 96h (h)

4.10.2 Produtividade em Astaxantina

A produtividade do processo em relação a astaxantina pode ser obtida pela equação (8), segundo HISS (2001, p. 96).

$$P_p = (P - P_o) / t_r \quad (8)$$

Onde:

P_p = produtividade em astaxantina (mg/l/h)

P = concentração volumétrica de astaxantina no final do processo, ou seja, rendimento em astaxantina (mg/l)

P_o = concentração volumétrica de astaxantina no início do processo (mg/l)

t_r = tempo de cultivo, ou seja, 96h (h)

4.10.3 Rendimento em Biomassa

O rendimento em biomassa do processo, ou seja, a biomassa obtida no final do processo, pode ser calculada pela equação (9).

$$X = X_a \quad (9)$$

Onde:

X = rendimento em biomassa (g/l)

X_a = biomassa no final do processo, obtida pela equação (1) (g/l)

4.10.4 Rendimento em Astaxantina

O rendimento em astaxantina, ou seja, a concentração volumétrica de astaxantina obtida no final do processo, pode ser calculada pela equação (10).

$$P = P_v = (P_{p/x} \times X) / 1.000 \quad (10)$$

Onde:

P = rendimento em astaxantina (mg/l)

P_v = concentração volumétrica de astaxantina no final do processo, obtida pela equação (3) (mg/l)

P_{p/x} = rendimento de astaxantina em relação a biomassa (µg astaxantina/g biomassa)

X = rendimento em biomassa (g/l)

4.10.5 Rendimento de Astaxantina em Relação à Biomassa

O rendimento de astaxantina em relação à biomassa, ou seja, a concentração ou conteúdo celular de astaxantina obtida no final do processo, pode ser calculada pela equação (11).

$$P_{p/x} = P_y = (P / X) \times 1.000 \quad (11)$$

Onde:

P_{p/x} = rendimento de astaxantina em relação à biomassa (µg astaxantina/g biomassa)

P_y = concentração celular de astaxantina no final do processo, obtida pela equação (2) (µg astaxantina/g biomassa)

P = rendimento em astaxantina (mg/l)

X = rendimento em biomassa (g/l)

4.10.6 Fator de Conversão de Substrato em Biomassa

O processo pode ser avaliado a partir da quantidade de biomassa formada em relação à quantidade de açúcares totais consumida pelo microorganismo. Este valor pode ser expresso pelo fator de conversão de substrato em biomassa, obtido pela equação (12), segundo HISS (2001, p. 97).

$$Y_{x/s} = (X_t - X_o) / (S_t - S) \quad (12)$$

Onde:

$Y_{x/s}$ = fator de conversão de substrato em biomassa (g biomassa obtida/g açúcar total consumido)

X_t = peso seco ou massa celular no final do processo (g)

X_o = peso seco ou massa celular no início do processo (g)

S_t = massa total de açúcares totais fornecida ao sistema (g)

S = massa de açúcares totais residual no final do processo (g)

4.10.7 Fator de Conversão de Substrato em Astaxantina

O processo pode ser avaliado a partir da quantidade de astaxantina formada em relação à quantidade de açúcares totais utilizada pelo microorganismo. Este valor pode ser expresso pelo fator de conversão astaxantina por substrato, obtido pela equação (13), segundo HISS (2001, p. 97).

$$Y_{p/s} = (P_t - P_o) / (S_t - S) \quad (13)$$

Onde:

$Y_{p/s}$ = fator de conversão de substrato em astaxantina (g astaxantina obtida/g açúcar total consumido)

P_t = massa de astaxantina no final do processo (g)

P_o = massa de astaxantina no início do processo (g)

S_t = massa total de açúcares totais fornecida ao sistema (g)

S = massa de açúcares totais residual no final do processo (g)

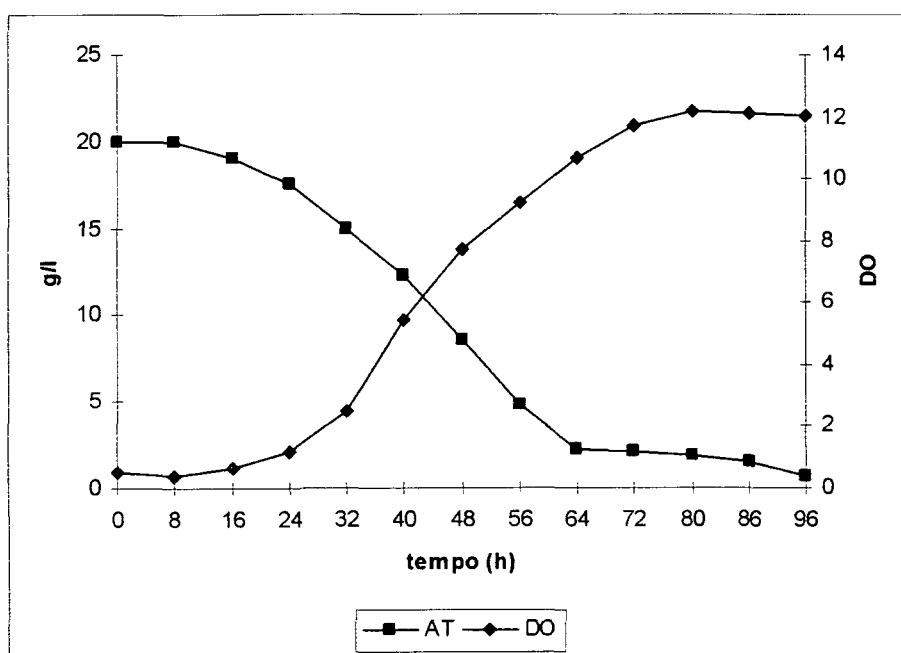
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PROCESSOS DESCONTÍNUOS

O cultivo da levedura *P. rhodozyma* em processos descontínuos foi realizado a fim de se verificar a produção de biomassa e astaxantina neste tipo de processo e substratos, em biorreatores, assim como servir de referência na otimização por processos descontínuo alimentado.

Os resultados obtidos no processo descontínuo estudado encontram-se no GRÁFICO 1 e TABELA 1.

GRÁFICO 1 - CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS E FORMAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO NO PROCESSO DESCONTÍNUO



NOTA:

- AT: concentração de açúcares totais no meio de cultivo (g/l)
- DO: densidade ótica do meio de cultivo

No GRÁFICO 1, analisando o crescimento celular, pode-se observar uma fase lag ou de latência, imediatamente após a inoculação do meio até 16h de processo, onde ocorre a adaptação do microorganismo e síntese de enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes no meio. Entre 16h e 32h é possível observar uma fase de transição, onde se observa o início da reprodução microbiana propriamente dita. Esta fase é seguida pela fase logarítmica ou

exponencial, onde a velocidade de crescimento é máxima. Esta fase pode ser observada entre 32h e 64h. As fases seguintes observadas são a fase linear e de desaceleração do crescimento, observada entre 64h e 80h, onde a velocidade de crescimento diminui em função do esgotamento da fonte de carbono no meio de cultivo a partir de 64h. As fases que se seguem são as fases estacionárias e de declínio celular, a partir de 80h. Nestas fases, a biomassa atinge o seu valor máximo e constante, onde ocorre um balanço entre a velocidade de crescimento e a velocidade de morte do microorganismo, seguida por uma diminuição na concentração celular em função do aumento da velocidade de morte celular comparada com a velocidade de formação de células novas.

Os resultados obtidos neste processo, relacionados aos rendimentos, produtividades e fatores de conversão estão relacionados na TABELA 1.

TABELA 1 - RESULTADOS OBTIDOS NO PROCESSO DESCONTÍNUO

X	P	P _{p/x}	P _x	P _p	Y _{x/s}	Y _{p/s}
6,90	2,52	364,59	0,072	0,026	0,36	1,31 x 10 ⁻⁴

NOTA:

- X: rendimento em biomassa (g/l)
- P: rendimento em astaxantina (mg/l)
- P_{p/x}: rendimento de astaxantina em relação à biomassa (µg astaxantina/g biomassa)
- P_x: produtividade em biomassa (g/l/h)
- P_p: produtividade em astaxantina (mg/l/h)
- Y_{x/s}: fator de conversão de substrato em biomassa (g biomassa obtida/g açúcar total consumido)
- Y_{p/s}: fator de conversão de substrato em astaxantina (g astaxantina obtida/g açúcar total consumido)

CHOCIAI et al. (2002, p. 457-462) utilizaram os mesmos substratos (caldo de cana e uréia) para a produção de astaxantina pela levedura *P. rhodozyma* em processos descontínuos, porém seus experimentos foram realizados em incubadora com agitação orbital. Obtiveram um rendimento em biomassa e astaxantina de 4,7 g/l e 1,34 mg/l, respectivamente, e uma concentração celular de astaxantina em torno de 285 µg/g biomassa. As produtividades em biomassa e astaxantina obtidas foram de 0,049 g/l/h e 0,014 mg/l/h, respectivamente. Comparando estes resultados com os resultados obtidos no processo descontínuo estudado, podemos observar um aumento em todos os rendimentos e produtividades. Em função do aumento na biomassa e astaxantina produzida, podemos deduzir que os fatores de conversão também aumentaram no processo estudado. O cultivo da levedura *P. rhodozyma* em

incubadora com agitação orbital pode não ter garantido um ambiente de elevada aerobiose, promovendo uma diminuição no fator de conversão de substrato em biomassa e um provável aumento na produção de etanol. YAMANE et al. (1997b, p. 4472-4473) verificaram que em condições decrescentes de aerobiose a levedura aumentava a produção de etanol, com conseqüente diminuição na produtividade de biomassa e astaxantina, em função do efeito Pasteur. Em baixas condições de aerobiose, JOHNSON e LEWIS (1979, p. 179-182) também verificaram um decréscimo no fator de conversão de substrato em biomassa, acompanhado por um decréscimo na concentração celular de astaxantina. FANG e CHIOU (1996, p. 175-181) verificaram que o aumento na taxa de aeração promovia um aumento na produção de biomassa pela levedura *P. rhodozyma*. O cultivo de microorganismos em biorreatores permite uma maior eficiência no fornecimento e controle da concentração do oxigênio dissolvido no meio de cultivo, garantindo ambientes com elevada aerobiose e permitindo uma maior conversão do substrato em biomassa e astaxantina e uma redução na produção de etanol.

Os resultados obtidos também demonstram que a levedura *P. rhodozyma* se adapta ao cultivo em biorreatores, indicando a possível escalabilidade do processo e despertando interesse para a produção industrial de astaxantina no meio estudado.

Com relação ao fator de conversão de substrato em biomassa, podemos observar que o valor obtido no processo descontínuo estudado (0,36) é semelhante ao fator de 0,33 obtido por MEYER e DU PREEZ (1994a, p. 179), utilizando suco de uva como principal substrato. Por outro lado, é inferior aos valores obtidos por PARAJO et al. (1997, p. 352), PARAJO, SANTOS e VÁZQUEZ (1998b, p. 505), VÁZQUEZ, SANTOS e PARAJO (1998, p. 48) e KUSDIYANTINI et al. (1998, p. 932) em processos descontínuos, ou seja, 0,47, 0,56, 0,54 e 0,50, respectivamente. Estes autores utilizaram como substrato hidrolisados enzimáticos de pinho, fração hemicelulósica hidrolisada de eucalipto, hidrolisado de eucalipto e meio sintético (glicerol), respectivamente. Estes resultados indicam que a fonte de carbono utilizada no cultivo da levedura influencia na conversão de substrato em biomassa.

Com relação ao fator de conversão de substrato em astaxantina, KUSDIYANTINI et al. (1998, p. 932) verificou um fator de conversão de $9,7 \times 10^{-4}$, superior ao valor obtido no processo descontínuo estudado ($1,31 \times 10^{-4}$).

Na literatura são encontrados trabalhos referentes ao cultivo da levedura *P. rhodozyma* em processos descontínuos e descontínuo alimentado, utilizando cepas selvagens ou mutantes, cultivadas em diferentes meios de cultivo, em biorreatores.

TABELA 2 - PRODUTIVIDADE EM BIOMASSA DE PROCESSOS DESCONTÍNUOS E DESCONTÍNUO ALIMENTADO, UTILIZANDO CEPAS SELVAGENS OU MUTANTES DA LEVEDURA *P. rhodozyma* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO

AUTOR	CEPA	MP	PROCESSO	P _x
AN et al., 1996	M	sintético	I	0,458
YAMANE et al., 1997a	S	sintético	C	0,214
HO; TAM; ZHOU, 1999 (A)	M	sintético	C	0,181
AN; JANG; CHO, 2001	M	melaço	I	0,180
HO; TAM; ZHOU, 1999 (B)	M	sintético	C	0,153
KUSDIYANTINI et al., 1998	S	sintético	D	0,148
PARAJÓ; SANTOS; VAZQUEZ, 1998b	S	eucalipto	D	0,143
CHOCIAI et al., 2002	S	caldo de cana	I	0,096
VÁZQUEZ; SANTOS; PARAJÓ, 1998	S	eucalipto	D	0,090
VÁZQUEZ; SANTOS; PARAJÓ, 1998	S	eucalipto	R	0,082
HAYMAN; MANNARELLI; LEATHERS, 1995	S	milho	D	0,079
CRUZ; PARAJÓ, 1998	S	eucalipto	D	0,052
CHOCIAI et al., 2002	S	caldo de cana	D	0,049
MEYER; DU PREEZ, 1994a	M	suco de uva	D	0,048
ACHEAMPONG; MARTIN, 1995	S	turfa	D	0,041
PARAJÓ et al., 1997	S	pinho	D	0,039
VÁZQUEZ; SANTOS; PARAJÓ, 1998	S	eucalipto	C	0,020

NOTA:

- MP: matéria-prima
- P_x: produtividade em biomassa (g/l/h)
- M: cepa mutante
- S: cepa selvagem
- D: processo descontínuo
- I: processo descontínuo alimentado com alimentação intermitente
- C: processo descontínuo alimentado com alimentação contínua
- R: processo descontínuo alimentado repetitivo

Na TABELA 2 podemos observar dados descritos na literatura relacionados à produtividade em biomassa pela levedura *P. rhodozyma*, em diferentes tipos de processos fermentativos e meios de cultivo. A TABELA 2 é classificada em ordem

decrecente de produtividade em biomassa, um importante parâmetro de referência em processos industriais, uma vez que relaciona produção de biomassa por unidade de tempo.

TABELA 3 - PRODUTIVIDADE EM ASTAXANTINA DE PROCESSOS DESCONTÍNUOS E DESCONTÍNUO ALIMENTADO, UTILIZANDO CEPAS SELVAGENS OU MUTANTES DA LEVEDURA *P. rhodozyma* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO

AUTOR	CEPA	MP	PROCESSO	P _p
AN et al., 1996	M	sintético	I	0,504
KUSDIYANTINI et al., 1998	S	sintético	D	0,200
AN; JANG; CHO, 2001	M	melaço	I	0,198
YAMANE et al., 1997a	S	sintético	C	0,154
VÁZQUEZ; SANTOS; PARAJO, 1998	S	eucalipto	R	0,082
PARAJÓ; SANTOS; VAZQUEZ, 1998b	S	eucalipto	D	0,079
MEYER; DU PREEZ, 1994a	M	suco de uva	D	0,065
HO; TAM; ZHOU, 1999 (B)	M	sintético	C	0,063
HO; TAM; ZHOU, 1999 (A)	M	sintético	C	0,056
VÁZQUEZ; SANTOS; PARAJO, 1998	S	eucalipto	D	0,047
ACHEAMPONG; MARTIN, 1995	S	turfa	D	0,044
HAYMAN; MANNARELLI; LEATHERS, 1995	S	milho	D	0,025
CHOCIAI et al., 2002	S	caldo de cana	I	0,025
VÁZQUEZ; SANTOS; PARAJO, 1998	S	eucalipto	C	0,016
CHOCIAI et al., 2002	S	caldo de cana	D	0,014
CRUZ; PARAJO, 1998	S	eucalipto	D	0,011
PARAJÓ et al., 1997	S	pinho	D	0,010

NOTA:

- MP: matéria-prima
- P_p: produtividade em astaxantina (mg/l/h)
- M: cepa mutante
- S: cepa selvagem
- D: processo descontínuo
- I: processo descontínuo alimentado com alimentação intermitente
- C: processo descontínuo alimentado com alimentação contínua
- R: processo descontínuo alimentado repetitivo

Na TABELA 3 podemos observar dados descritos na literatura relacionados à produtividade em astaxantina pela levedura *P. rhodozyma*, em diferentes tipos de processos fermentativos e meios de cultivo. A TABELA 3 é classificada em ordem

decrecente de produtividade em astaxantina, outro importante parâmetro de referência em processos industriais, uma vez que relaciona produção de astaxantina por unidade de tempo.

Podemos observar nas TABELAS 2 e 3 que as produtividades variam de acordo com a eficiência do processo fermentativo utilizado, assim como com o tipo de cepa e meio de cultivo utilizado, mas as melhores produtividades estão geralmente associadas a processos descontínuo alimentado.

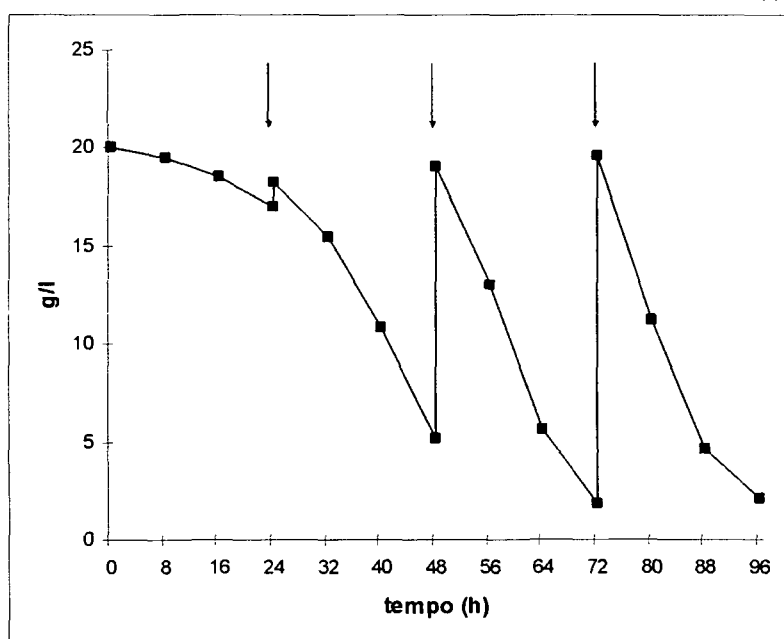
Na TABELAS 2 e 3 podemos observar a utilização de processos descontínuo alimentado com alimentação contínua em diversos processos. Esta alimentação contínua pode ser realizada em resposta à variação de diferentes parâmetros no meio de cultivo. YAMANE et al. (1997a, p. 1109-1111) realizou a alimentação em duas etapas, sendo que na primeira etapa a taxa de alimentação era controlada por pH-stat e na segunda etapa por DO-stat. HO, TAM e ZHOU (1999, p. 175-177) estudaram o efeito da alimentação constante, exponencial e controlada por pH e DO-stat. Os melhores resultados foram obtidos pelo controle da alimentação por DO-stat ($P_x = 0,181$ e $P_p = 0,056$, A) e exponencial ($P_x = 0,153$ e $P_p = 0,063$, B). VÁZQUEZ, SANTOS e PARAJO (1998, p. 46-48) realizaram a alimentação com uma taxa constante, sem resposta à variações no meio de cultivo.

Comparando os valores das produtividades obtidas no processo descontínuo estudado com os valores descritos na literatura (TABELAS 2 e 3), obtidos em processos descontínuos, verificamos que a utilização de caldo de cana e uréia como substratos aparece em um patamar intermediário de produtividade, fornecendo um processo e substratos promissores e competitivos em produtividade na produção de astaxantina e biomassa pela levedura *P. rhodozyma*. Entretanto, fornece uma produtividade em biomassa e astaxantina muito abaixo dos melhores processos descritos na literatura, otimizados por processos descontínuo alimentado. Desta forma, a otimização da produção de astaxantina e biomassa pela levedura *P. rhodozyma* deve ser realizada, a fim de promover um aumento nas produtividades e permitir a obtenção de um processo capaz de competir com os melhores processos descritos na literatura.

5.2 PROCESSOS DESCONTÍNUO ALIMENTADO INTERMITENTE

A fim de verificar o efeito da alimentação intermitente na produção de biomassa e astaxantina pela levedura *P. rhodozyma* e promover uma otimização na sua produção, realizaram-se experimentos utilizando processos descontínuo alimentado intermitente. Os resultados obtidos são apresentados nos GRÁFICOS 2 e 3 e TABELA 4.

GRÁFICO 2 - VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO INTERMITENTE



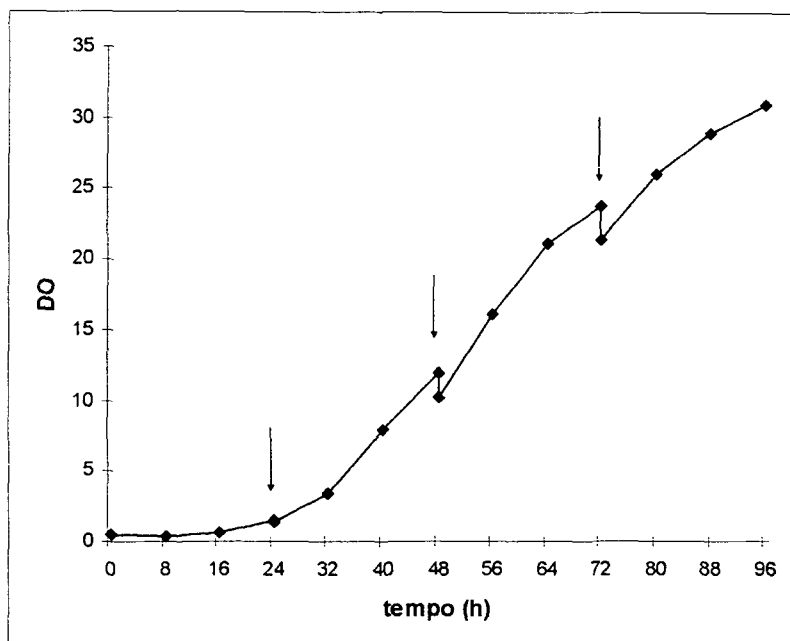
NOTA:

- AT: concentração de açúcares totais no meio de cultivo (g/l)
- as setas indicam os tempos de alimentação

As alimentações com solução nutritiva, realizadas em 24h (23 ml), 48h (150 ml) e 72h (214 ml) de cultivo, foram capazes de restaurar a concentração de açúcares totais do meio de cultivo para aproximadamente 20 g/l, como pode ser observado no GRÁFICO 2.

A adição de solução nutritiva promoveu uma diluição no meio de cultivo, ocasionando uma conseqüente diluição na biomassa e diminuição na densidade ótica, como observado no GRÁFICO 3.

GRÁFICO 3 - FORMAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO INTERMITENTE



NOTA:

- DO: densidade ótica
- as setas indicam os tempos de alimentação

Os resultados obtidos no processo descontínuo alimentado intermitente, relacionados aos rendimentos, produtividades e fatores de conversão estão relacionados na TABELA 4.

TABELA 4 - RESULTADOS OBTIDOS NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO INTERMITENTE

X	P	$P_{p/x}$	P_x	P_p	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
18,75	5,69	303,34	0,195	0,059	0,39	$1,17 \times 10^{-4}$

NOTA:

- X: rendimento em biomassa (g/l)
- P: rendimento em astaxantina (mg/l)
- $P_{p/x}$: rendimento de astaxantina em relação à biomassa (μg astaxantina / g biomassa)
- P_x : produtividade em biomassa (g/l/h)
- P_p : produtividade em astaxantina (mg/l/h)
- $Y_{x/s}$: fator de conversão de substrato em biomassa (g biomassa obtida/g açúcar total consumido)
- $Y_{p/s}$: fator de conversão de substrato em astaxantina (g astaxantina obtida/g açúcar total consumido)

A TABELA 5 apresenta a relação entre os resultados obtidos nos processos descontínuo alimentado intermitente e descontínuo estudados.

Podemos observar que a utilização de processo descontínuo alimentado intermitente resultou em um rendimento e produtividade em biomassa 2,72 vezes

maior que o rendimento e produtividade obtidos no processo descontínuo estudado. Conseqüentemente, resultou em um aumento no rendimento e produtividade em astaxantina de 2,26 vezes. Porém, observamos uma diminuição no conteúdo celular de astaxantina, resultando em um conteúdo 0,83 vezes menor que o conteúdo obtido no processo descontínuo estudado. O fator de conversão de substrato em biomassa também aumentou (1,08 vezes), indicando que o suprimento de substrato foi utilizado no crescimento celular e não apenas na manutenção celular do microorganismo, apesar da perda no fator de conversão de astaxantina por substrato utilizado.

TABELA 5 - RELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO INTERMITENTE E OS RESULTADOS OBTIDOS NO PROCESSO DESCONTÍNUO ESTUDADO

PROCESSO	X	P	$P_{p/x}$	P_x	P_p	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
Descontínuo	2,72	2,26	0,83	2,72	2,26	1,08	0,89

NOTA:

- X: rendimento em biomassa (g/l)
- P: rendimento em astaxantina (mg/l)
- $P_{p/x}$: rendimento de astaxantina em relação à biomassa (μg astaxantina/g biomassa)
- P_x : produtividade em biomassa (g/l/h)
- P_p : produtividade em astaxantina (mg/l/h)
- $Y_{x/s}$: fator de conversão de substrato em biomassa
- $Y_{p/s}$: fator de conversão de substrato em astaxantina

Podemos observar no GRÁFICO 3 que, ao contrário do observado no processo descontínuo estudado, o crescimento celular não entra na fase estacionária, uma vez que o processo é interrompido durante a fase de desaceleração no crescimento. JOHNSON e LEWIS (1979, p. 175) e MEYER e DU PREEZ (1993, p. 922-923) verificaram que a astaxantina era produzida principalmente durante a fase exponencial do crescimento, mas também que sua produção continuava durante a fase estacionária, porém em uma menor taxa de produção. Desta forma, a fim de se obter a produtividade máxima de astaxantina, sugeriram que o cultivo deveria ser mantido na fase estacionária por um certo período. Entretanto, no processo descontínuo estudado, verificou-se que a concentração celular de astaxantina não variava após 72h de cultivo, apesar de ocorrer um aumento no rendimento em biomassa de 6,05 g/l para 6,9 g/l. Desta forma, as oscilações na concentração de açúcares totais no meio de cultivo,

causadas pela adição de solução nutritiva, ocasionando variações bruscas na osmolaridade do meio de cultivo, podem ter sido responsáveis pela redução na concentração celular de astaxantina observada neste processo, quando comparada com o processo descontínuo estudado.

CHOCIAI et al. (2002, p. 457-462) utilizaram um meio de cultivo constituído dos mesmos substratos (caldo de cana e uréia) para a produção de astaxantina pela levedura *P. rhodozyma* por processos descontínuo alimentado intermitente, assim como os mesmos tempos de alimentação e a mesma concentração de solução nutritiva, porém em incubadoras com agitação orbital. Também observaram uma diminuição na concentração celular de astaxantina utilizando este tipo de processo. Obtiveram um rendimento em biomassa de 9,2 g/l, em astaxantina de 2,37 mg/l e uma concentração celular de astaxantina de 259 µg/g biomassa. As produtividades em biomassa e astaxantina obtidas foram de 0,096 g/l/h e 0,025 mg/l/h, respectivamente. Comparando com os resultados obtidos no processo descontínuo alimentado intermitente estudado, podemos observar um aumento em todos os rendimentos e produtividades, assim como nos fatores de conversão. A dificuldade em se manter um ambiente com elevada aerobiose em incubadores com agitação orbital pode ter sido responsável pela redução nas taxas de conversão, desviando a conversão de substrato em biomassa para a produção de etanol. A mesma redução nas taxas de conversão também pode ser observada comparando os resultados obtidos pelos processos descontínuos, confirmando a influência da concentração de oxigênio dissolvido na produção de biomassa e astaxantina pela levedura *P. rhodozyma*.

Comparando a produtividade em biomassa obtida no processo descontínuo alimentado intermitente estudado com as descritas na literatura (TABELA 2), podemos observar que os resultados obtidos encontram-se entre os melhores em produtividade. Entretanto, comparando a produtividade em astaxantina obtida com as descritas na literatura (TABELA 3), verificamos que os resultados obtidos ainda não são capazes de competir em produtividade com os melhores resultados da literatura, provavelmente em função da perda no conteúdo celular de astaxantina verificada no processo descontínuo alimentado intermitente estudado.

Em função dos resultados obtidos, verificamos a necessidade de otimização do processo com o objetivo de evitar a perda no conteúdo celular de astaxantina,

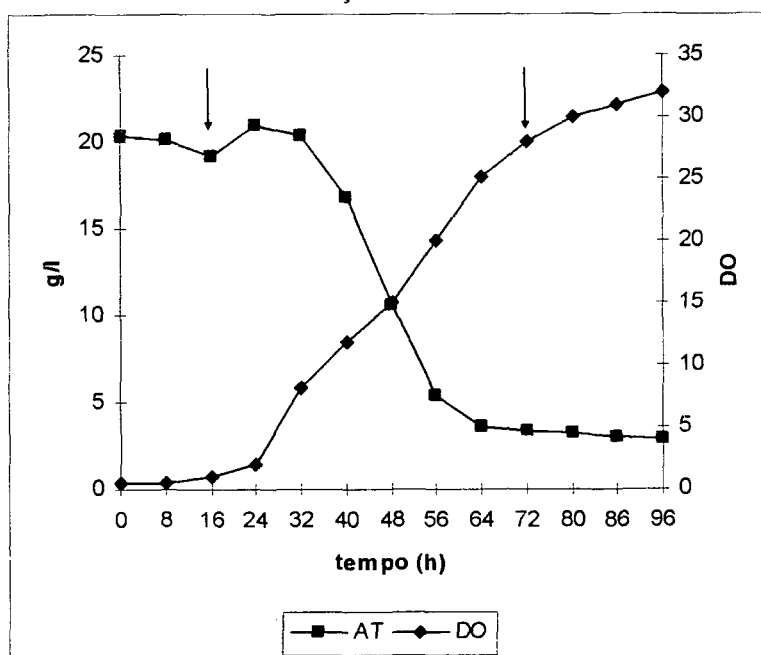
aumentar a produtividade da mesma e, desta forma, estabelecer um processo competitivo em produtividade com os processos descritos na literatura.

5.3 PROCESSOS DESCONTÍNUO ALIMENTADO COM ALIMENTAÇÃO CONTÍNUA

Um processo descontínuo alimentado, além da alimentação intermitente, também pode ser alimentado continuamente. A fim de verificar os efeitos deste tipo de alimentação na produção de biomassa e astaxantina pela levedura *P. rhodozyma* e buscar a otimização e maximização das produtividades por este tipo de processo, foram realizados experimentos adicionando-se ao meio de cultivo solução nutritiva na concentração de 100 g/l de açúcares totais, em uma taxa de alimentação capaz de satisfazer as taxas de consumo de açúcares totais obtidas nos processos descontínuo alimentado intermitente, em cada intervalo de tempo.

Os resultados obtidos neste processo estão demonstrados no GRÁFICO 4 e TABELA 6.

GRÁFICO 4 - VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS E FORMAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO COM ALIMENTAÇÃO CONTÍNUA



NOTA:

- AT: concentração de açúcares totais no meio de cultivo (g/l)
- DO: densidade ótica
- as setas indicam o início e fim da alimentação

Foram adicionados 444 ml de solução nutritiva no meio de cultivo, nas seguintes vazões:

- 16 a 24h: 3 ml/h
- 24 a 32h: 3,75 ml/h
- 32 a 40h: 6,125 ml/h
- 40 a 48 h: 7,5 ml/h
- 48 a 56h: 9,5 ml/h
- 56 a 64h: 11,5 ml/h
- 64 a 72h: 14,125 ml/h

Os resultados obtidos no processo descontínuo alimentado com alimentação contínua, relacionados aos rendimentos, produtividades e fatores de conversão estão relacionados na TABELA 6.

TABELA 6 - RESULTADOS OBTIDOS NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO COM ALIMENTAÇÃO CONTÍNUA

X	P	P _{p/x}	P _x	P _p	Y _{x/s}	Y _{p/s}
19,35	7,44	383,73	0,202	0,078	0,41	1,57 x 10 ⁻⁴

NOTA:

- X: rendimento em biomassa (g/l)
- P: rendimento em astaxantina (mg/l)
- P_{p/x}: rendimento de astaxantina em relação à biomassa (μg astaxantina/g biomassa)
- P_x: produtividade em biomassa (g/l/h)
- P_p: produtividade em astaxantina (mg/l/h)
- Y_{x/s}: fator de conversão de substrato em biomassa (g biomassa obtida/g açúcar total consumido)
- Y_{p/s}: fator de conversão de substrato em astaxantina (g astaxantina obtida/g açúcar total consumido)

Uma comparação dos resultados obtidos no processo descontínuo alimentado com alimentação contínua com os resultados obtidos nos processos estudados anteriormente pode ser observada na TABELA 7.

Comparando os resultados obtidos no processo descontínuo alimentado com alimentação contínua estudado com os resultados obtidos em processos descontínuos e descontínuo alimentado com alimentação intermitente, podemos observar um ganho em todas as produtividades, rendimentos e fatores de conversão. Apesar do aumento no rendimento e produtividade em biomassa não ser significativo (1,03 vezes) quando comparado ao processo descontínuo alimentado intermitente estudado, verificamos que o conteúdo celular de astaxantina obtido

neste processo não diminuiu quando comparado com o conteúdo obtido no processo descontínuo estudado, ao contrário do que ocorreu com o processo descontínuo alimentado intermitente estudado.

TABELA 7 - RELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO COM ALIMENTAÇÃO CONTÍNUA E OS RESULTADOS OBTIDOS NOS PROCESSOS DESCONTÍNUO E DESCONTÍNUO ALIMENTADO INTERMITENTE ESTUDADOS

PROCESSO	X	P	$P_{p/x}$	P_x	P_p	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
Descontínuo	2,80	2,95	1,05	2,80	2,95	1,14	1,20
Intermitente	1,03	1,31	1,27	1,03	1,31	1,05	1,34

NOTA:

- X: rendimento em biomassa (g/l)
- P: rendimento em astaxantina (mg/l)
- $P_{p/x}$: rendimento de astaxantina em relação à biomassa (μg astaxantina/g biomassa)
- P_x : produtividade em biomassa (g/l/h)
- P_p : produtividade em astaxantina (mg/l/h)
- $Y_{x/s}$: fator de conversão de substrato em biomassa (g biomassa obtida/g açúcar total consumido)
- $Y_{p/s}$: fator de conversão de substrato em astaxantina (g astaxantina obtida/g açúcar total consumido)

O aumento nos fatores de conversão indica uma maior eficiência na conversão de substrato em biomassa e astaxantina no processo descontínuo alimentado com alimentação contínua estudado. VÁZQUEZ, SANTOS e PARAJÓ (1998, p. 48) obtiveram um fator de conversão de substrato em biomassa de 0,19, utilizando alimentação contínua, muito abaixo do obtido no processo descontínuo alimentado com alimentação contínua estudado (0,41), indicando uma deficiência na conversão de substrato em biomassa.

Comparando a produtividade em biomassa obtida no processo descontínuo alimentado com alimentação contínua estudado com as descritas na literatura (TABELA 2), podemos observar que os resultados obtidos ainda encontram-se entre os melhores da literatura. A utilização da alimentação contínua evitou a perda no conteúdo celular de astaxantina, permitindo um aumento na produtividade e rendimento em astaxantina (1,31 vezes) quando comparada com o processo com alimentação intermitente estudado, permitindo a obtenção de um processo mais competitivo em produtividade em astaxantina quando comparado com os processos descritos na literatura (TABELA 3).

Desta forma, a utilização de alimentação contínua aparece como uma alternativa interessante na otimização da produção de astaxantina e biomassa pela levedura *P. rhodozyma*, uma vez que permite a obtenção de elevada biomassa sem perda no rendimento e produtividade em astaxantina. As produtividades obtidas aparecem entre as melhores da literatura, mas a otimização ainda se faz necessária a fim de maximizar as variáveis de resposta do processo, aumentando desta forma a competitividade do bioprocessos e despertando interesse a nível industrial.

5.4 PROCESSOS DESCONTÍNUO ALIMENTADO ESTENDIDO

Uma vez que a alimentação contínua de solução nutritiva evita as perdas no conteúdo celular de astaxantina, a utilização de processos descontínuo alimentado estendido aparece como uma ferramenta interessante na otimização da produção de astaxantina e biomassa pela levedura *P. rhodozyma*.

Inicialmente, utilizou-se a solução nutritiva na concentração de 100 g/l de açúcares totais. A influência deste processo na produção de biomassa e astaxantina pela levedura pode ser observada no GRÁFICO 5 e TABELA 8.

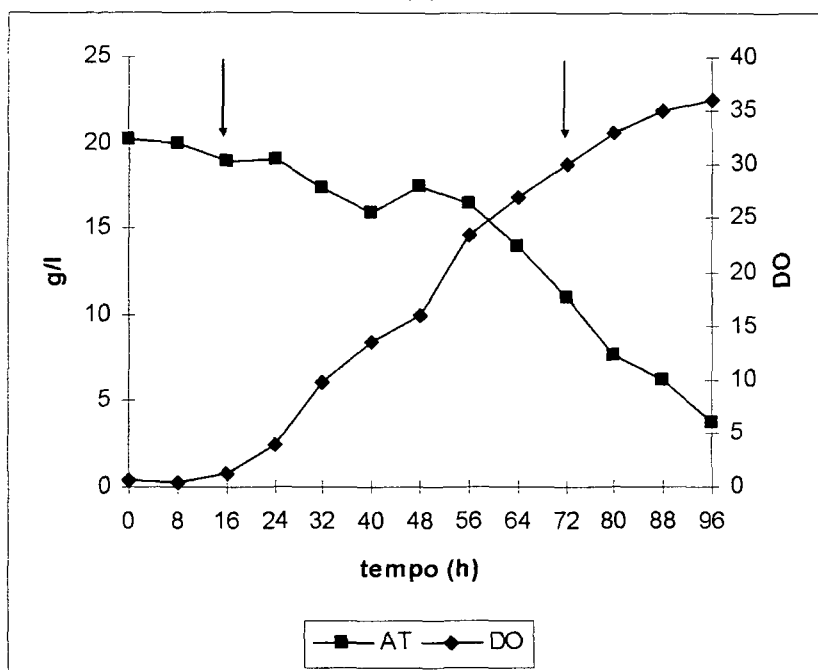
Foram adicionados 799 ml de solução nutritiva, no intervalo de 16h e 72h de cultivo, nas seguintes vazões:

- 16 a 24h: 3,75 ml/h
- 24 a 32h: 5,75 ml/h
- 32 a 40h: 11,125 ml/h
- 40 a 48 h: 17,75 ml/h
- 48 a 56h: 19,125 ml/h
- 56 a 64h: 20,5 ml/h
- 64 a 72h: 21,875 ml/h

Como pode ser observado no GRÁFICO 5, a adição da solução nutritiva não foi capaz de manter a concentração de açúcares totais desejada no meio de cultivo durante o período de alimentação. Para tanto, seriam necessários aproximadamente 980 ml de solução nutritiva. Entretanto, este volume extravasaria o volume útil do biorreator. Caso o volume inicial de meio de cultivo no biorreator fosse reduzido, abaixo de 0,8 l, talvez fosse possível de se manter a concentração desejada.

Entretanto, volumes abaixo de 0,8 l estão fora de alcance dos eletrodos de pH e pO_2 , inviabilizando os controles destas variáveis no meio de cultivo.

GRÁFICO 5 - VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS E FORMAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO ESTENDIDO (100 g/l)



NOTA:

- AT: concentração de açúcares totais no meio de cultivo (g/l)
- DO: densidade ótica
- as setas indicam o início e fim da alimentação

Os resultados obtidos no processo descontínuo alimentado estendido estudado, relacionados às produtividades, rendimentos e fatores de conversão, podem ser observados na TABELA 8.

TABELA 8 - RESULTADOS OBTIDOS NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO ESTENDIDO (100 g/l)

X	P	$P_{p/x}$	P_x	P_p	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
21,60	7,94	367,48	0,225	0,083	0,39	$1,42 \times 10^{-4}$

NOTA:

- X: rendimento em biomassa (g/l)
- P: rendimento em astaxantina (mg/l)
- $P_{p/x}$: rendimento de astaxantina em relação à biomassa (μg astaxantina/g biomassa)
- P_x : produtividade em biomassa (g/l/h)
- P_p : produtividade em astaxantina (mg/l/h)
- $Y_{x/s}$: fator de conversão de substrato em biomassa (g biomassa obtida/g açúcar total consumido)
- $Y_{p/s}$: fator de conversão de substrato em astaxantina (g astaxantina obtida/g açúcar total consumido)

Uma comparação dos resultados obtidos neste processo com os resultados obtidos nos experimentos anteriores pode ser observada na TABELA 9.

TABELA 9 - RELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO ESTENDIDO (100 g/l) E OS RESULTADOS OBTIDOS NOS PROCESSOS DESCONTÍNUO, DESCONTÍNUO ALIMENTADO INTERMITENTE E COM ALIMENTAÇÃO CONTÍNUA ESTUDADOS

PROCESSO	X	P	$P_{p/x}$	P_x	P_p	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
Descontínuo	3,13	3,15	1,01	3,13	3,15	1,08	1,08
Intermitente	1,15	1,40	1,21	1,15	1,40	1,00	1,21
Contínua	1,12	1,07	0,96	1,12	1,07	0,95	0,90

NOTA:

- X: rendimento em biomassa (g/l)
- P: rendimento em astaxantina (mg/l)
- $P_{p/x}$: rendimento de astaxantina em relação à biomassa (μg astaxantina / g biomassa)
- P_x : produtividade em biomassa (g/l/h)
- P_p : produtividade em astaxantina (mg/l/h)
- $Y_{x/s}$: fator de conversão de substrato em biomassa (g biomassa obtida/g açúcar total consumido)
- $Y_{p/s}$: fator de conversão de substrato em astaxantina (g astaxantina obtida/g açúcar total consumido)

Quando comparado com o processo descontínuo alimentado com alimentação contínua, verificou-se que o aumento na produtividade e rendimento em biomassa (1,12 vezes) e astaxantina (1,07 vezes) não eram significativos. Entretanto, verificou-se também que, assim como no processo com alimentação contínua, o conteúdo celular de astaxantina não diminuía, quando comparado com o processo descontínuo estudado.

Desta forma, uma solução nutritiva na concentração de 100 g/l de açúcares totais mostrou-se uma solução de alimentação diluída para este tipo de processo. A medida que se tentava manter a concentração do meio de cultivo em torno de 20 g/l de açúcares totais, promovia-se uma diluição na biomassa e astaxantina formada em função do grande volume de solução nutritiva adicionado e, desta forma, o rendimento e produtividade em biomassa e astaxantina não aumentou significativamente, quando comparado com o processo descontínuo alimentado com alimentação contínua estudado, como pode ser observado na TABELA 9.

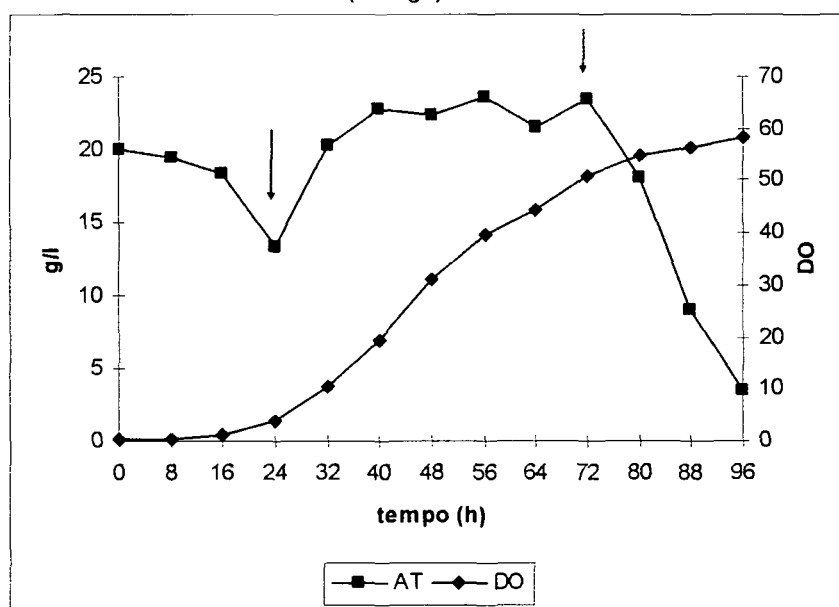
Entretanto, verificou-se que este tipo de processo também pode ser uma ferramenta interessante na otimização da produção de astaxantina e biomassa pela

levedura *P. rhodozyma*, uma vez que não promove perdas no conteúdo celular de astaxantina, quando comparado ao processo descontínuo estudado.

Em função dos resultados obtidos, optou-se pela utilização de solução nutritiva mais concentrada, a fim de se conseguir manter a concentração desejada de açúcares totais no meio de cultivo e, com isso, diminuir a diluição causada no meio, promovendo uma concentração na biomassa e, conseqüentemente, aumentando os rendimentos do processo.

Desta forma, utilizou-se solução nutritiva na concentração de 250 g/l de açúcares totais, ou seja, caldo de cana puro sem diluição. Os resultados obtidos podem ser observados no GRÁFICO 6, FIGURA 6 e TABELA 10.

GRÁFICO 6 - VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS E FORMAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO ESTENDIDO (250 g/l)



NOTA:

- AT: concentração de açúcares totais no meio de cultivo (g/l)
- DO: densidade ótica
- as setas indicam o início e fim da alimentação

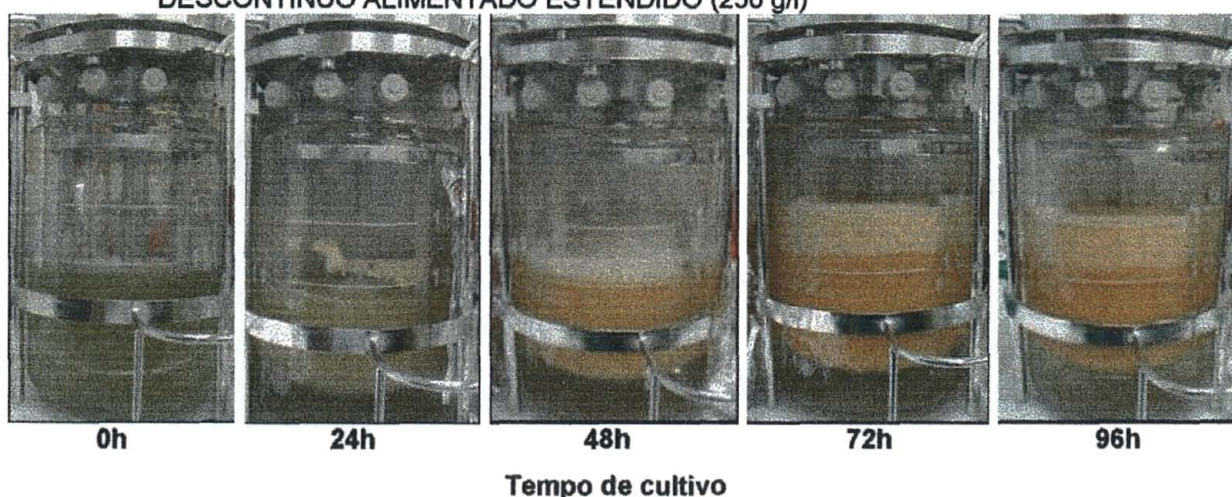
Como pode ser observado no GRÁFICO 6, a utilização de uma solução mais concentrada permitiu a manutenção da concentração de açúcares totais no meio de cultivo em torno de 20 g/l, dentro dos limites de capacidade no biorreator.

Foram utilizados 306 ml de solução nutritiva na concentração de 250 g/l de açúcares totais na alimentação, entre 24h e 72h de cultivo, nas seguintes vazões:

- 24 a 32h: 3,75 ml/h
- 32 a 40h: 3,75 ml/h
- 40 a 48 h: 4,75 ml/h
- 48 a 56h: 7 ml/h
- 56 a 64h: 9,125 ml/h
- 64 a 72h: 10,125 ml/h

A FIGURA 6 mostra o crescimento celular e a variação na pigmentação durante o processo descontínuo alimentado estendido estudado.

FIGURA 6 - CRESCIMENTO CELULAR E VARIAÇÃO NA PIGMENTAÇÃO NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO ESTENDIDO (250 g/l)



Os resultados obtidos no processo descontínuo alimentado estendido (250 g/l) estudado, relacionados às produtividades, rendimentos e fatores de conversão, podem ser observados na TABELA 10.

TABELA 10 - RESULTADOS OBTIDOS NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO ESTENDIDO (250 g/l)

X	P	$P_{p/x}$	P_x	P_p	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
31,40	11,91	379,18	0,327	0,124	0,39	$1,46 \times 10^{-4}$

NOTA:

- X: rendimento em biomassa (g/l)
- P: rendimento em astaxantina (mg/l)
- $P_{p/x}$: rendimento de astaxantina em relação à biomassa (μg astaxantina/g biomassa)
- P_x : produtividade em biomassa (g/l/h)
- P_p : produtividade em astaxantina (mg/l/h)
- $Y_{x/s}$: fator de conversão de substrato em biomassa (g biomassa obtida/g açúcar total consumido)
- $Y_{p/s}$: fator de conversão de substrato em astaxantina (g astaxantina obtida/g açúcar total consumido)

Comparando os resultados obtidos no processo descontínuo alimentado estendido (250 g/l) com os resultados obtidos nos processos descontínuo, descontínuo alimentado intermitente, com alimentação contínua e estendido (100 g/l) estudados (TABELA 11), verificamos que a utilização de uma solução nutritiva mais concentrada na alimentação promoveu uma diminuição na diluição do meio de cultivo, promovendo uma concentração na biomassa e aumento nos rendimentos e produtividades, tanto de biomassa (1,45 vezes) como de astaxantina (1,50 vezes), quando comparado com o processo estendido com solução nutritiva na concentração de 100 g/l de açúcares totais estudado. Além disso, verificou-se que a concentração celular de astaxantina era mantida praticamente constante quando comparada ao mesmo processo.

TABELA 11 - RELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO ESTENDIDO (250 g/l) E OS RESULTADOS OBTIDOS NOS PROCESSOS DESCONTÍNUO, DESCONTÍNUO ALIMENTADO INTERMITENTE, COM ALIMENTAÇÃO CONTÍNUA E ESTENDIDO (100 g/l) ESTUDADOS

PROCESSO	X	P	$P_{p/x}$	P_x	P_p	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
Descontínuo	4,55	4,73	1,04	4,55	4,73	1,08	1,11
Intermitente	1,67	2,09	1,25	1,67	2,09	1,00	1,25
Contínua	1,62	1,60	0,99	1,62	1,60	0,95	0,93
Estendido (100 g/l)	1,45	1,50	1,03	1,45	1,50	1,00	1,03

NOTA:

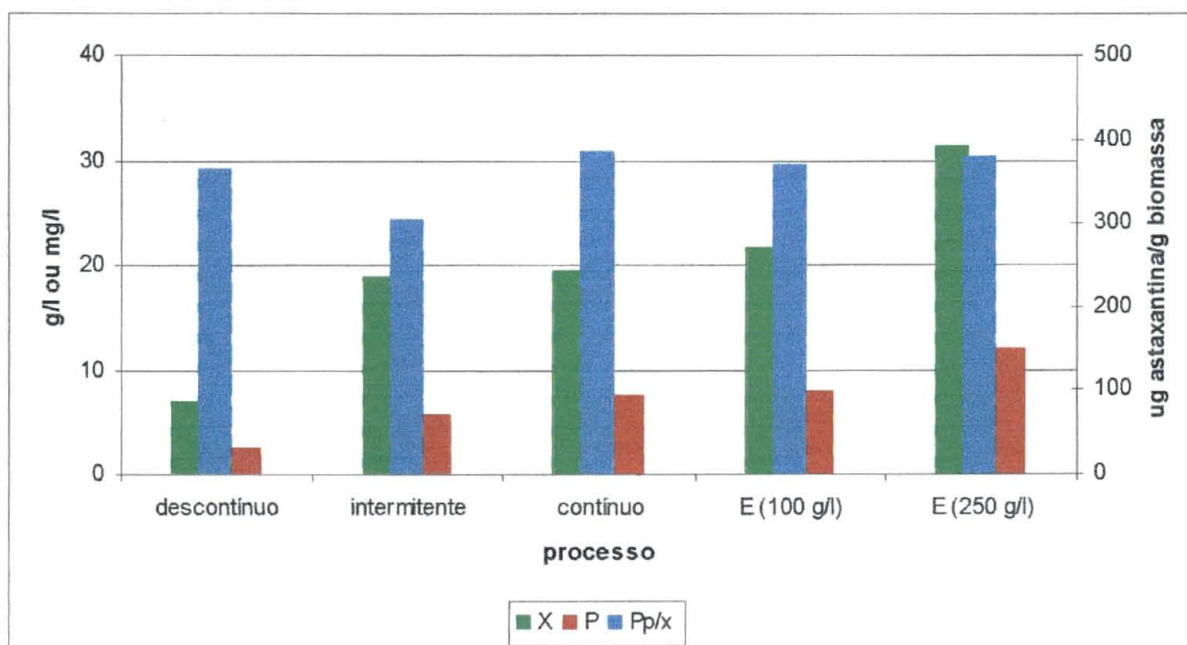
- X: rendimento em biomassa (g/l)
- P: rendimento em astaxantina (mg/l)
- $P_{p/x}$: rendimento de astaxantina em relação à biomassa (μg astaxantina/g biomassa)
- P_x : produtividade em biomassa (g/l/h)
- P_p : produtividade em astaxantina (mg/l/h)
- $Y_{x/s}$: fator de conversão de substrato em biomassa (g biomassa obtida/g açúcar total consumido)
- $Y_{p/s}$: fator de conversão de substrato em astaxantina (g astaxantina obtida/g açúcar total consumido)

A comparação dos resultados obtidos nos processos estudados também pode ser realizada observando-se os GRÁFICOS 7, 8 e 9.

Observando os rendimentos e produtividades em biomassa obtidos nos processos estudados (TABELA 11, GRÁFICOS 7 e 8), verificamos que a utilização de processos descontínuo alimentado promove um aumento na biomassa obtida. Entretanto, em processo descontínuo alimentado com alimentação contínua, intermitente e estendido (100 g/l), o rendimento e produtividade em biomassa

permanecem praticamente constante. Por outro lado, a utilização de uma solução nutritiva mais concentrada no processo estendido permitiu uma menor diluição do meio de cultivo, concentrando a biomassa e aumentando o rendimento e produtividade do processo. Quando comparada com o processo descontínuo, observamos um aumento de 4,55 vezes no rendimento e produtividade em biomassa.

GRÁFICO 7 - COMPARAÇÃO ENTRE OS RENDIMENTOS OBTIDOS NOS PROCESSOS ESTUDADOS



NOTA:

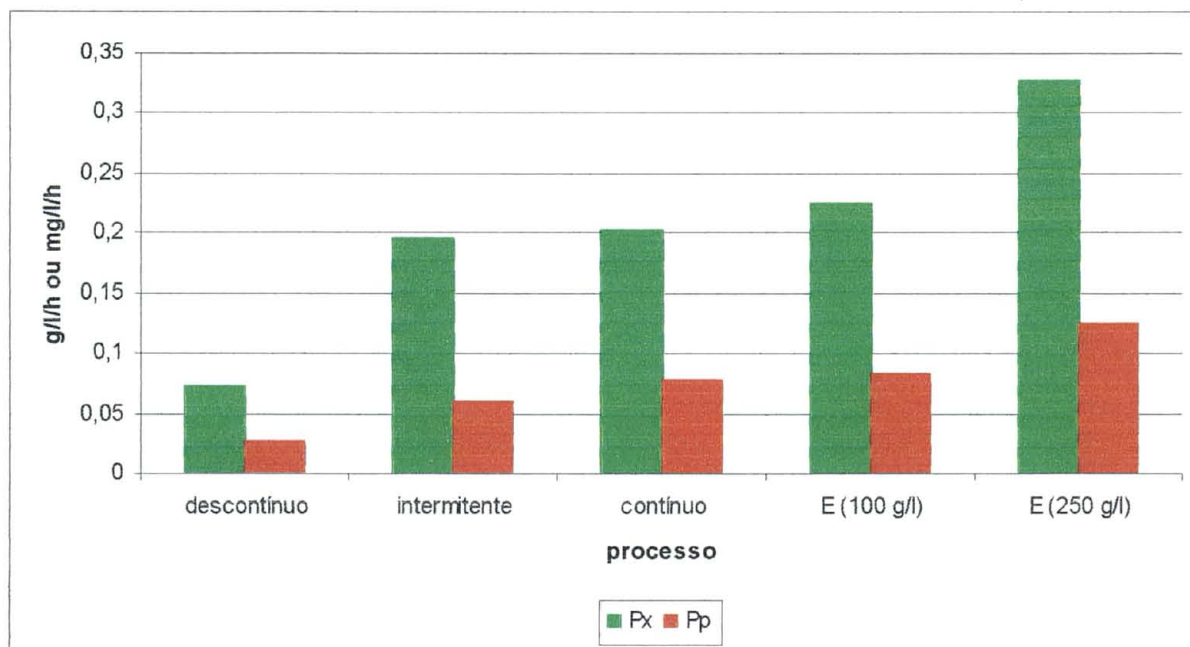
- E: processo descontínuo alimentado estendido
- X: rendimento em biomassa (g/l)
- P: rendimento em astaxantina (mg/l)
- $P_{p/x}$: rendimento de astaxantina em relação à biomassa (µg astaxantina / g biomassa)

O conteúdo celular de astaxantina manteve-se praticamente constante em todos os processos estudados, com exceção do processo com alimentação intermitente (TABELA 11 e GRÁFICO 7).

A utilização de processos descontínuo alimentado também permitiu uma otimização do processo em relação a astaxantina, aumentando a produtividade e rendimento da mesma (TABELA 11, GRÁFICOS 7 e 8). Os melhores resultados foram obtidos em processos descontínuo alimentado estendido alimentado com caldo de cana puro. Neste processo, obteve-se um ganho no rendimento e produtividade em astaxantina em torno de 4,73 vezes, quando comparado com o processo descontínuo estudado. A utilização de processos com alimentação

contínua e estendida (100 g/l) forneceram rendimentos e produtividades semelhantes. O processo com alimentação intermitente estudado foi o que apresentou o menor rendimento e produtividade em astaxantina dentre os processos alimentados estudados, em função da perda no conteúdo celular de astaxantina.

GRÁFICO 8 - COMPARAÇÃO ENTRE AS PRODUTIVIDADES OBTIDAS NOS PROCESSOS ESTUDADOS

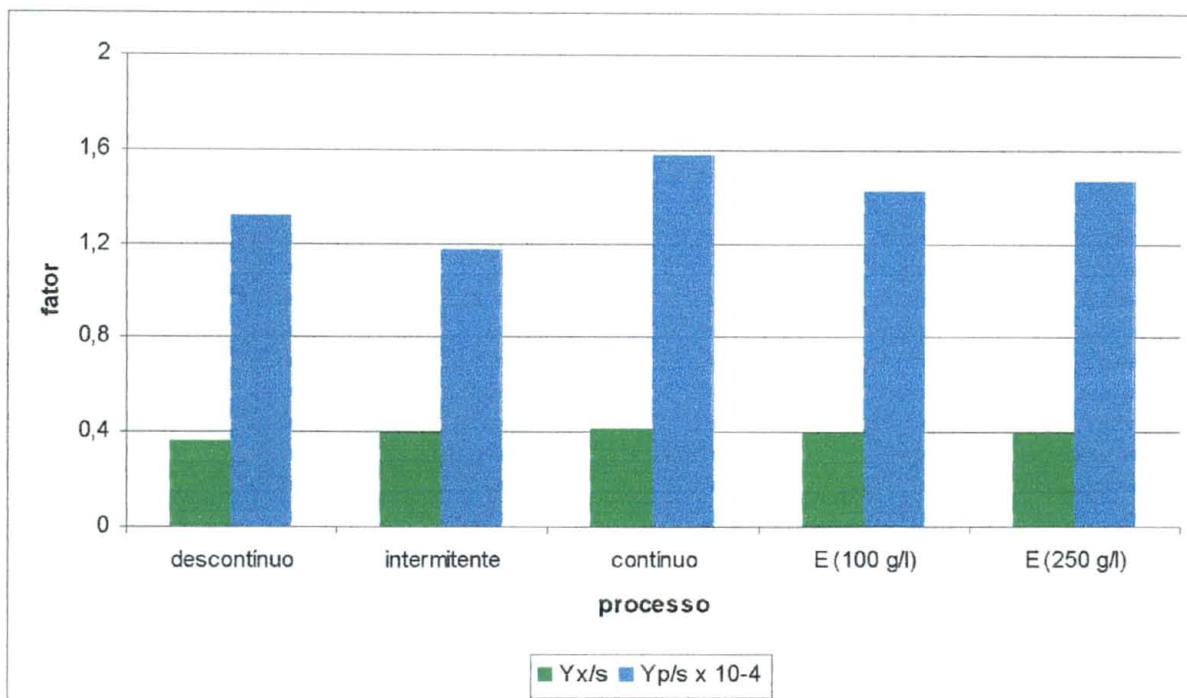


NOTA:

- E: processo descontinuo alimentado estendido
- P_x: produtividade em biomassa (g/l/h)
- P_p: produtividade em astaxantina (mg/l/h)

O fator de conversão de substrato em biomassa manteve-se praticamente constante em todos os processos estudados (TABELA 11 e GRÁFICO 9), indicando que o substrato consumido pelo microorganismo estava sendo convertido em biomassa e não estava sendo utilizado na produção de etanol. Além disso, indica que a manutenção de um ambiente de elevada aerobiose foi eficiente e era realmente necessária a fim de se evitar o efeito Pasteur (JOHNSON; LEWIS, 1979, p. 179-182; YAMANE et al., 1997b, p. 4472-4473). O fator de conversão de substrato em astaxantina também se manteve praticamente constante em todos os processos, com exceção do processo descontinuo com alimentação intermitente, onde se verificou uma diminuição provavelmente em função das perdas no conteúdo celular de astaxantina.

GRÁFICO 9 - COMPARAÇÃO ENTRE OS FATORES DE CONVERSÃO OBTIDOS NOS PROCESSOS ESTUDADOS



NOTA:

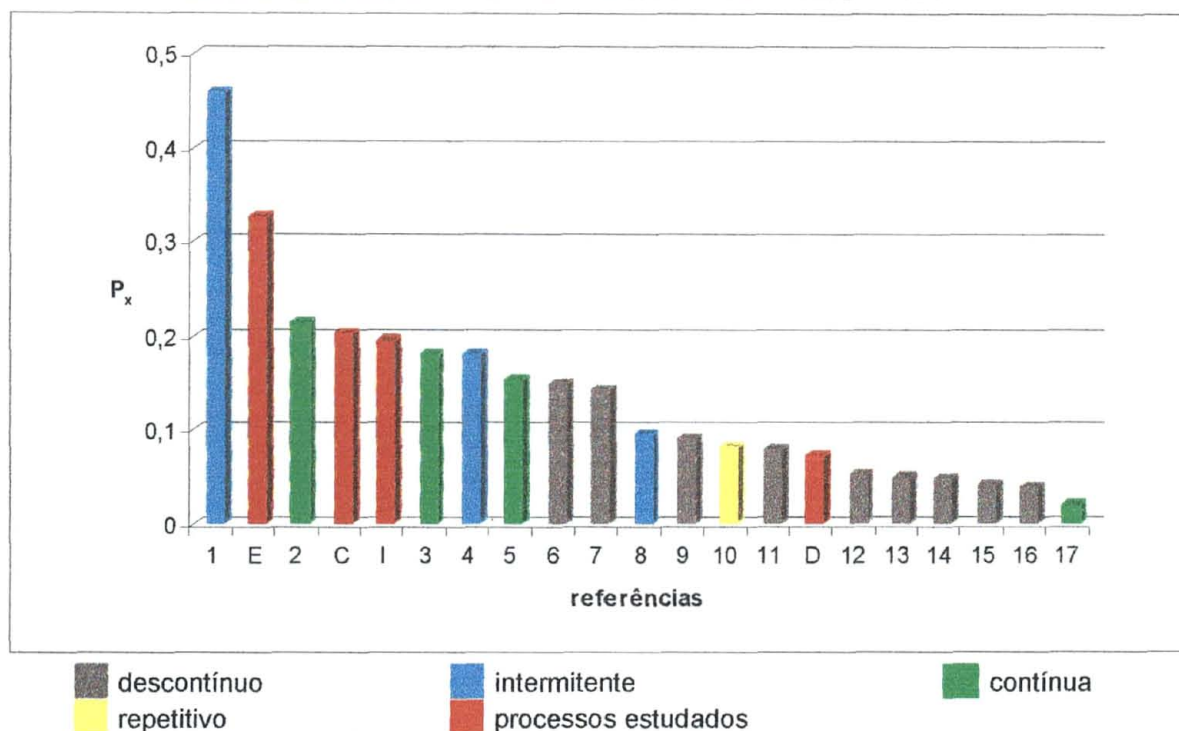
- E: processo descontinuo alimentado estendido
- $Y_{x/s}$: fator de conversão de substrato em biomassa
- $Y_{p/s}$: fator de conversão de substrato em astaxantina

Desta forma, os melhores resultados em rendimento e produtividade em astaxantina e biomassa foram obtidos utilizando processos descontinuo alimentado estendido com solução nutritiva na concentração de 250 g/l de açúcares totais (caldo de cana puro).

Os GRÁFICOS 10 e 11 apresentam uma comparação das produtividades obtidas nos processos estudados com a literatura.

Comparando a produtividade em biomassa obtida no processo descontinuo alimentado estendido estudado (250 g/l) com os valores descritos na literatura (TABELA 2 e GRÁFICO 10), verificamos que a produtividade obtida encontra-se entre os melhores valores, sendo superada apenas pela produtividade obtida por AN et al. (1996, p. 515-518). Entretanto, estes autores utilizaram um meio sintético no cultivo da levedura *P. rhodozyma* e, como salientado pelos próprios autores, o meio sintético utilizado apresenta um custo elevado que dificulta a viabilidade do processo a nível industrial.

GRÁFICO 10 - COMPARAÇÃO DA PRODUTIVIDADE EM BIOMASSA OBTIDA NOS PROCESSOS ESTUDADOS COM VALORES DESCRITOS NA LITERATURA



NOTA:

- P_x : produtividade em biomassa (g/l/h)

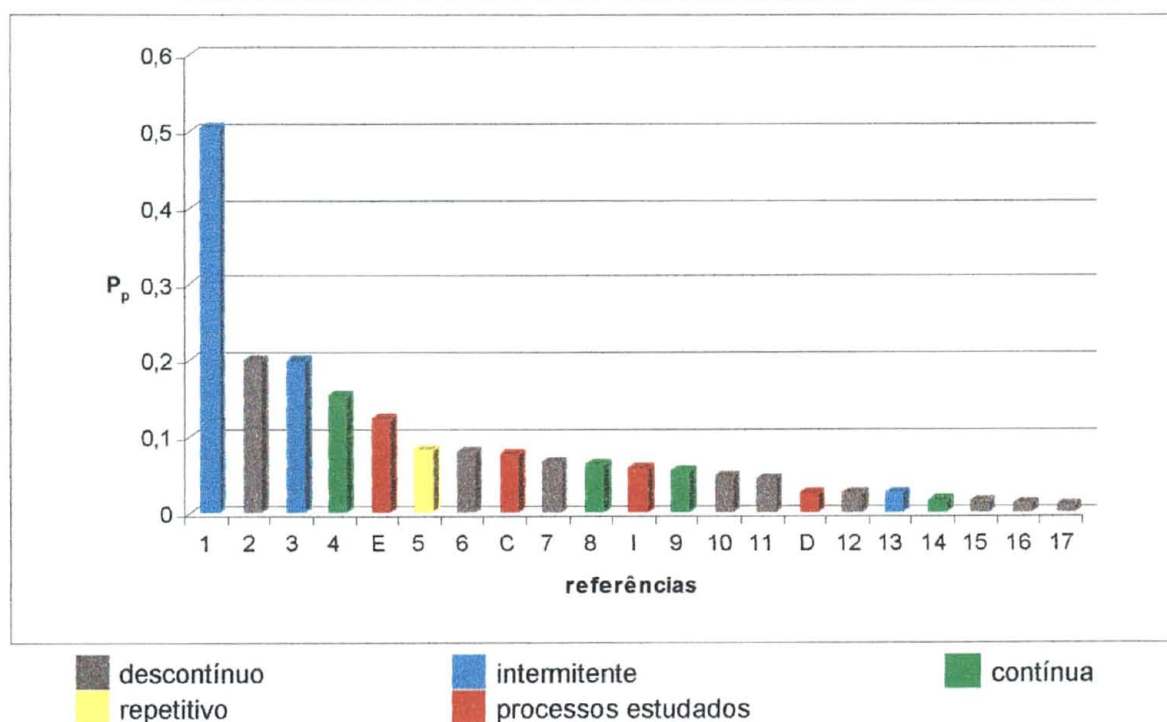
Referências:

- | | |
|--|--|
| 1- AN et al., 1996 | 9- VÁZQUEZ; SANTOS; PARAJÓ, 1998 |
| E- Processo estendido estudado (250 g/l) | 10- VÁZQUEZ; SANTOS; PARAJÓ, 1998 |
| 2- YAMANE et al., 1997a | 11- HAYMAN; MANNARELLI; LEATHERS, 1995 |
| C- Alimentação contínua estudada | D - Processo descontínuo estudado |
| I - Alimentação intermitente estudada | 12- CRUZ; PARAJÓ, 1998 |
| 3- HO; TAM; ZHOU, 1999 (A) | 13- CHOCIAL et al., 2002 |
| 4- AN; JANG; CHO, 2001 | 14- MEYER; DU PREEZ, 1994a |
| 5- HO; TAM; ZHOU, 1999 (B) | 15- ACHEAMPONG; MARTIN, 1995 |
| 6- KUSDIYANTINI et al., 1998 | 16- PARAJÓ et al., 1997 |
| 7- PARAJÓ; SANTOS; VÁZQUEZ, 1998b | 17- VÁZQUEZ; SANTOS; PARAJÓ, 1998 |
| 8- CHOCIAL et al., 2002 | |

Comparando a produtividade em astaxantina obtida no processo descontínuo alimentado estendido estudado (250 g/l) com os valores descritos na literatura (TABELA 3 e GRÁFICO 11), verificamos que a produtividade obtida é inferior apenas às produtividades obtidas em processos que utilizam cepas mutantes (AN et al., 1996, p. 515-518; AN; JANG; CHO, 2001, p. 121-125) e meios sintéticos (AN et al., 1996, p. 515-518; YAMANE et al., 1997a, p. 1109-1111; KUSDIYANTINI et al., 1998, p. 929-934). Cepas mutantes estão freqüentemente associadas a um elevado conteúdo celular de astaxantina e, quando cultivadas em processos descontínuo alimentado otimizados, capazes de fornecer uma elevada produtividade

em biomassa, fornecem uma elevada produtividade em astaxantina. Entretanto, a estabilidade genética das cepas selvagens ainda é um fator importante que deve ser considerado no escalonamento destes processos, uma vez que as mutantes apresentam uma elevada taxa de reversão. A utilização de meios sintéticos, apesar de fornecer uma maior produtividade em astaxantina em alguns casos, apresenta um custo elevado que inviabiliza a sua utilização a nível industrial.

GRÁFICO 11 - COMPARAÇÃO DA PRODUTIVIDADE EM ASTAXANTINA OBTIDA NOS PROCESSOS ESTUDADOS COM VALORES DESCRITOS NA LITERATURA



NOTA:

- P_p: produtividade em astaxantina (mg/l/h)

Referências:

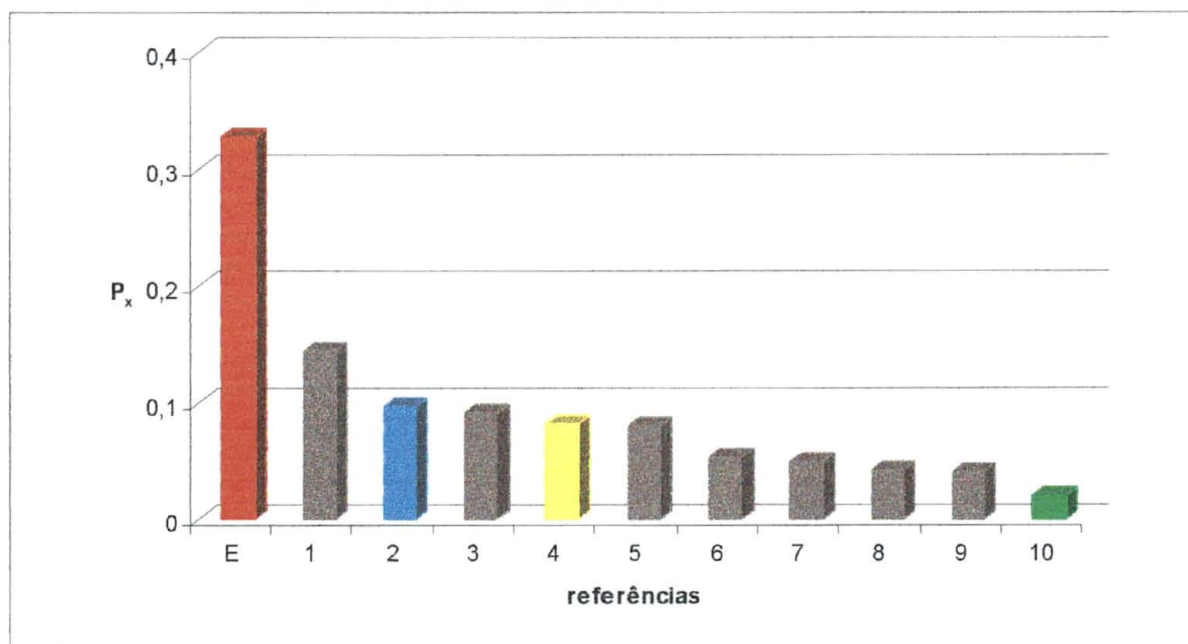
- | | |
|--|--|
| 1- AN et al., 1996 | 9- HO; TAM; ZHOU, 1999 (A) |
| 2- KUSDIYANTINI et al., 1998 | 10- VÁZQUEZ; SANTOS; PARAJO, 1998 |
| 3- AN; JANG; CHO, 2001 | 11- ACHEAMPONG; MARTIN, 1995 |
| 4- YAMANE et al., 1997a | D - Processo descontínuo estudado |
| E- Processo estendido estudado (250 g/l) | 12- HAYMAN; MANNARELLI; LEATHERS, 1995 |
| 5- VÁZQUEZ; SANTOS; PARAJO, 1998 | 13- CHOCIAL et al., 2002 |
| 6- PARAJO; SANTOS; VAZQUEZ, 1998b | 14- VÁZQUEZ; SANTOS; PARAJO, 1998 |
| C- Alimentação contínua estudada | 15- CHOCIAL et al., 2002 |
| 7- MEYER; DU PREEZ, 1994a | 16- CRUZ; PARAJO, 1998 |
| 8- HO; TAM; ZHOU, 1999 (B) | 17- PARAJO et al., 1997 |
| I - Alimentação intermitente estudada | |

Comparando as produtividades obtidas no processo descontínuo alimentado estendido (250 g/l) estudado com produtividades descritas na literatura que utilizam

cepas selvagens e matérias-primas de baixo custo (GRÁFICOS 12 e 13), verificamos que o processo descontínuo alimentado estendido estudado, alimentado com caldo de cana puro, estabelecido e otimizado, é o que apresenta as maiores produtividades em astaxantina e biomassa da literatura.

Em relação à produtividade em biomassa, o processo descontínuo alimentado estendido (250 g/l) estudado apresenta uma produtividade em biomassa aproximadamente 2,29 vezes maior do que o processo descrito por PARAJÓ, SANTOS e VÁZQUEZ (1998b, p. 501-506) (GRÁFICO 12). Em relação à produtividade em astaxantina, o processo descontínuo alimentado estendido (250 g/l) estudado apresenta uma produtividade aproximadamente 1,51 vezes maior do que o processo descrito por VÁZQUEZ, SANTOS e PARAJÓ (1998, p. 43-55) (GRÁFICO 13).

GRÁFICO 12 - COMPARAÇÃO DA PRODUTIVIDADE EM BIOMASSA OBTIDA NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO ESTENDIDO (250 g/l) ESTUDADO COM PROCESSOS DESCRITOS NA LITERATURA UTILIZANDO CEPAS SELVAGENS E MATÉRIAS-PRIMAS DE BAIXO CUSTO



descontínuo
repetitivo

intermitente
processo estudado

contínua

NOTA:

- P_x : produtividade em biomassa (g/l/h)

Referências:

E- Processo estendido estudado (250 g/l)
1- PARAJÓ; SANTOS; VÁZQUEZ, 1998b
2- CHOCIAL et al., 2002
3- VÁZQUEZ; SANTOS; PARAJÓ, 1998

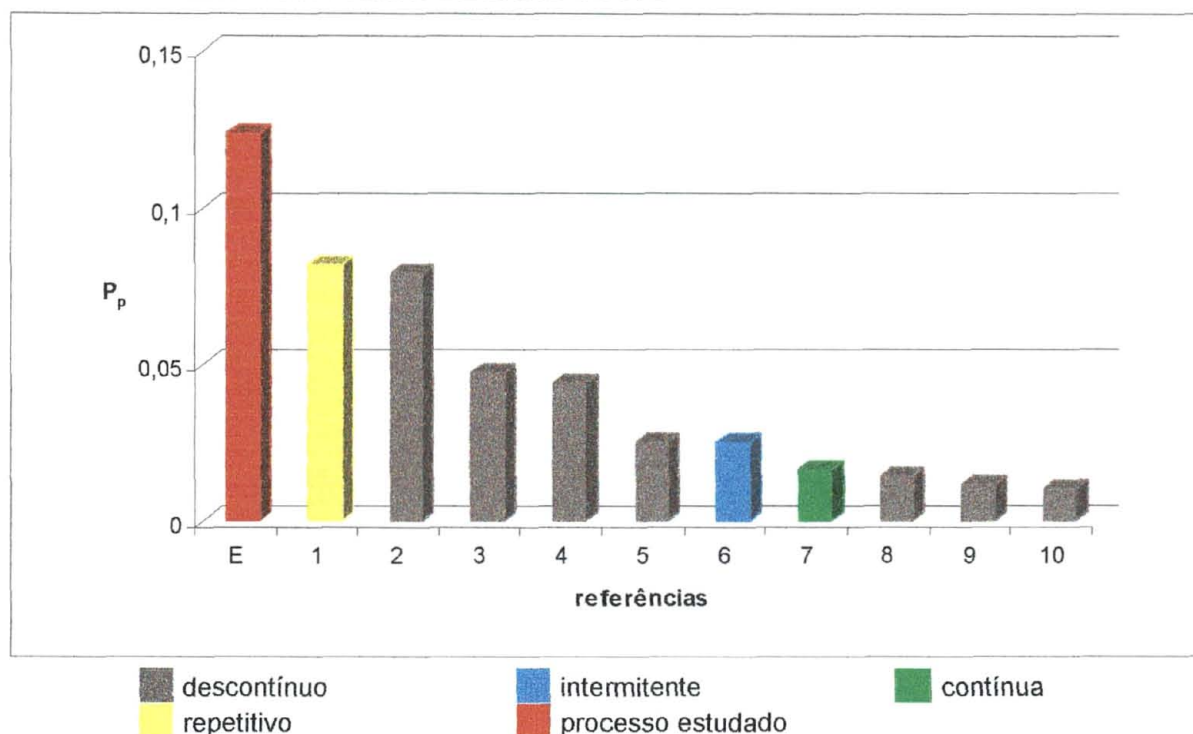
4- VÁZQUEZ; SANTOS; PARAJÓ, 1998
5- HAYMAN; MANNARELLI; LEATHERS, 1995
6- CRUZ; PARAJÓ, 1998
7- CHOCIAL et al., 2002

8- ACHEAMPONG; MARTIN, 1995

10- VÁZQUEZ; SANTOS; PARAJÓ, 1998

9- PARAJÓ et al., 1997

GRÁFICO 13 - COMPARAÇÃO DA PRODUTIVIDADE EM ASTAXANTINA OBTIDA NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO ESTENDIDO (250 g/l) ESTUDADO COM PROCESSOS DESCRITOS NA LITERATURA UTILIZANDO CEPAS SELVAGENS E MATÉRIAS-PRIMAS DE BAIXO CUSTO



NOTA:

- P_p: produtividade em astaxantina (mg/l/h)**Referências:**

E- Processo estendido estudado (250 g/l)
 1- VÁZQUEZ; SANTOS; PARAJÓ, 1998
 2- PARAJÓ; SANTOS; VÁZQUEZ, 1998b
 3- VÁZQUEZ; SANTOS; PARAJÓ, 1998
 4- ACHEAMPONG; MARTIN, 1995
 5- HAYMAN; MANNARELLI; LEATHERS, 1995

6- CHOCIAL et al., 2002
 7- VÁZQUEZ; SANTOS; PARAJÓ, 1998
 8- CHOCIAL et al., 2002
 9- CRUZ; PARAJÓ, 1998
 10- PARAJÓ et al., 1997

A utilização do caldo de cana-de-açúcar como fonte de carbono na produção de astaxantina agrega um valor em torno de \$0,53/g astaxantina obtida (JORNAL CANA, 2003). HAYMAN, MANNARELLI e LEATHERS (1995, p. 389) utilizando resíduos da moenda de milho, obtiveram valores de \$0,67 e 0,73/g carotenóides, utilizando duas de suas melhores matérias-primas. Quando se utiliza a glucose como fonte de carbono, o valor agregado pode ser até 1.000 vezes maior, considerando o mesmo fator de conversão de substrato em astaxantina pela levedura (SIGMA, 2003). Desta forma, a utilização do caldo de cana como fonte de carbono consegue competir em valor agregado com outras matérias-primas de baixo

custo e, em função da elevada redução nos custos quando comparada com glucose, utilizada em meios sintéticos, é capaz de despertar interesse e viabilizar sua utilização a nível industrial na produção de biomassa e astaxantina pela levedura *P. rhodozyma*.

6 CONCLUSÃO

A utilização de processos descontínuo alimentado, principalmente processos descontínuo alimentado estendido, permitiu a obtenção de um processo otimizado com elevada produtividade em biomassa e astaxantina, sem perda no conteúdo celular da mesma, capaz de competir em produtividade com os melhores processos descritos na literatura.

A utilização de matérias-primas de baixo custo como substrato (caldo de cana-de-açúcar e uréia) permite a diminuição nos custos de produção e, uma vez associada a um processo de elevada produtividade, desperta interesse a nível industrial.

Em trabalhos futuros, uma cepa mutante com elevado conteúdo celular de astaxantina e estabilidade genética deve ser obtida e, então, associada ao processo estabelecido e substrato utilizado, a fim de maximizar as produtividades e viabilizar ainda mais a sua aplicação a nível industrial.

REFERÊNCIAS

- ACHEAMPONG, E. A.; MARTIN, A. M. Kinetic studies on the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 147-155, 1995.
- AKIBA, Y. et al. Availability of cell wall-fractured yeast, *Phaffia rhodozyma*, containing high concentration of astaxanthin for egg yolk pigmentation. **Animal Science Journal**, v. 71, n. 3, p. 255-260, 2000a.
- AKIBA, Y. et al. Improved pigmentation of egg yolk by feeding of yeast *Phaffia rhodozyma* containing high concentration of astaxanthin in laying hens. **Japanese Poultry Science**, v. 37, n. 3, p. 162-170, 2000b.
- AKIBA, Y. et al. Meat color modification in broiler chickens by feeding yeast *Phaffia rhodozyma* containing high concentrations of astaxanthin. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 10, n. 2, p. 154-161, 2001a.
- AKIBA, Y. et al. Meat color of broiler chickens as affected by age and feeding of yeast *Phaffia rhodozyma* containing high concentrations of astaxanthin. **Animal Science Journal**, v. 72, n. 2, p. 147-153, 2001b.
- AKIBA, Y. et al. Pigmentation of egg yolk with yeast *Phaffia rhodozyma* containing high concentration of astaxanthin in laying hens fed on a low-carotenoid diet. **Japanese Poultry Science**, v. 37, n. 2, p. 77-85, 2000c.
- AN, G. H. et al. Iron (III) decreases astaxanthin production in *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). **Food Science and Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 204-207, 2001.
- AN, G. H. et al. Medium optimization for cultivation of carotenoid hyperproducing *Phaffia rhodozyma* mutant HT-5F01C. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, n. 5, p. 515-518, 1996.
- AN, G. H. Improved growth of the red yeast, *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*), in the presence of tricarboxylic acid cycle intermediates. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 12, p. 1005-1009, 2001.
- AN, G. H.; CHANG, K. W.; JOHNSON, E. A. Effect of oxygen radicals and aeration on carotenogenesis and growth of *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 103-109, 1996.
- AN, G. H.; CHO, M. H.; JOHNSON, E. A. Monocyclic carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 2, p. 189-193, 1999.
- AN, G. H.; JANG, B. G.; CHO, M. H. Cultivation of the carotenoid-hyperproducing mutant 2A2N of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*)

with molasses. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 2, p. 121-125, 2001.

AN, G. H.; JOHNSON, E. A. Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 57, p. 191-203, 1990.

AN, G. H.; SCHUMAN, D. B.; JOHNSON, E. A. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 116-124, 1989.

ANDREWES, A. G.; PHAFF, H. J.; STARR, M. P. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast. **Phytochemistry**, v. 15, 1003-1007, 1976.

ANDREWES, A. G.; STARR, M. P. (3R,3'R)-astaxanthin from yeast *Phaffia rhodozyma*. **Phytochemistry**, v. 15, 1009-1011, 1976.

BCC. **Global market for carotenoids to cross \$935 million by 2005**. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/editors/RGA-110.html>> Acesso em: 10 mai. 2003.

BON, J. A.; LEATHERS, T. D.; JAYASWAL, R. K. Isolation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 2, p. 109-112, 1997.

BONFIM, T. M. B. **Produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) a partir de meios de cultura de baixo custo**. Curitiba, 1999. 159 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

BORZANI, B. Fermentação semicontínua. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001. p. 219-222.

CALO, P. et al. Mevalonic acid increases trans-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 6, p. 575-578, 1995.

CALO, P.; GONZALEZ, T. The yeast *Phaffia rhodozyma* as an industrial source of astaxanthin. **Microbiologia SEM**, v. 11, p. 386-388, 1995.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001b. p. 205-218.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001a. p. 193-204.

CHAN, H. Y.; HO, K. P. Growth and carotenoid production by ph-stat cultures of *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 11, p. 953-958, 1999.

CHOCIAI, M. B. et al. Cultivo da levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) em processo descontínuo alimentado para produção de astaxantina. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 4, p. 457-462, 2002.

CHUN, S. B. et al. Strain improvement of *Phaffia rhodozyma* by protoplast fusion. **FEMS Microbiology Letters**, v. 93, n. 3, p. 221-226, 1992.

CRUZ, J. M.; PARAJO, J. C. Improved astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic wood hydrolysates containing glucose and cellobiose. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 479-484, 1998.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação contínua. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001. p. 223-246.

FANG, T. J.; CHENG, Y. S. Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 6, p. 466-469, 1993.

FANG, T. J.; CHIOU, T. Y. Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of the red yeast, *Phaffia rhodozyma* NCHU-FS501. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 175-181, 1996.

FANG, T. J.; WANG, J. M. Extractability of astaxanthin in a mixed culture of a carotenoid over-producing mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Bacillus circulans* in two-stage batch fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 11, p. 1235-1245, 2002.

FDA. **Phaffia yeast**. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/cfr73355.html>> Acesso em: 14 fev. 2003.

FLORES-COTERA, L. B.; SANCHEZ, S. Copper but not iron limitation increases astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in a chemically defined medium. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 10, p. 793-797, 2001.

FONTANA, J. D. et al. Bioproduction of carotenoids: the comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 2, p. 121-125, 1996a.

FONTANA, J. D. et al. Astaxanthinogenesis in the yeast *Phaffia rhodozyma* - optimization of low-cost culture media and yeast cell-wall lysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63, n. 5, p. 305-314, 1997.

FONTANA, J. D. et al. Culture of the astaxanthinogenic yeast *Phaffia rhodozyma* in low-cost media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57, n. 8, p. 413-422, 1996b.

GU, W. L.; AN, G. H.; JOHNSON, E. A. Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 114-117, 1997.

HAARD, N. F. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. **Biotechnology Letters**, v. 10, n. 9, p. 609-614, 1988.

HAYMAN, G. T.; MANNARELLI, B. M.; LEATHERS, T. D. Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* grown on media composed of corn wet-milling coproducts. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 389-395, 1995.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001. p. 93-122.

HO, K. P.; TAM, C. Y.; ZHOU, B. Growth and carotenoid production of *Phaffia rhodozyma* in fed-batch cultures with different feeding methods. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 2, p. 175-178, 1999.

JOHNSON, E. A.; AN, G. H. Astaxanthin from microbial sources. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 297-326, 1991.

JOHNSON, E. A.; CONKLIN, D. E.; LEWIS, M. J. Yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 34, n. 12, 2417-2421, 1977.

JOHNSON, E. A.; LEWIS, M. J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of General Microbiology**, v. 115, p. 173-183, 1979.

JORNAL CANA. **Cotações**. Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br>> Acesso em: 19 nov. 2003.

KUSDIYANTINI, E. et al. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 10, p. 929-934, 1998.

MARTIN, A. M. et al. Study of growth parameters for *Phaffia rhodozyma* cultivated in peat hydrolysates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 235-241, 1992.

MARTIN, A. M.; ACHEAMPONG, E.; PATEL, T. R. Production of astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* using peat hydrolysates as substrate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 58, n. 3, p. 223-230, 1993.

MCCOY, M. Astaxanthin market a hard one to crack. **Chemical and Engineering News**, v. 77, n. 14, p. 15-17, 1999.

MEYER, P. S.; DU PREEZ, J. C. Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 178-183, 1994a.

MEYER, P. S.; DU PREEZ, J. C. Effect of acetic acid on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 9, p. 919-924, 1993.

MEYER, P. S.; DU PREEZ, J. C. Effect of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 6, p. 780-785, 1994b.

MEYER, P. S.; DU PREEZ, J. C.; VANDYK, M. S. The effect of monoterpenes on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 2, p. 125-128, 1994.

MEYER, P. S.; DUPREEZ, J. C.; KILIAN, S. G. Selection and evaluation of astaxanthin overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 514-520, 1993.

OKAGBUE, R. N.; LEWIS, M. J. Autolysis of the red yeast *Phaffia rhodozyma* - a potential tool to facilitate extraction of astaxanthin. **Biotechnology Letters**, v. 6, n. 4, p. 247-250, 1984a.

OKAGBUE, R. N.; LEWIS, M. J. Influence of mixed culture conditions on yeast wall hydrolytic activity of *Bacillus circulans* WL-12 and on extractability of astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 59, n. 3, p. 243-255, 1985.

OKAGBUE, R. N.; LEWIS, M. J. Mixed culture of *Bacillus circulans* WL-12 and *Phaffia rhodozyma* on different carbon sources: yeast wall lytic enzyme production and extractability of astaxanthin. **Biotechnology Letters**, v. 5, n. 11, p. 731-736, 1983.

OKAGBUE, R. N.; LEWIS, M. J. Use of alfalfa residual juice as a substrate for propagation of the red yeast *Phaffia rhodozyma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 33-39, 1984b.

PALAGYI, Z.; FERENCZY, L.; VAGVOLGYI, C. Carbon-source assimilation pattern of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 95-97, 2001.

PARAJO, J. C. et al. Production of carotenoids by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic hydrolysates of prehydrolysed wood. **Food Chemistry**, v. 60, n. 3, p. 347-355, 1997.

PARAJO, J. C.; SANTOS, V.; VAZQUEZ, M. Co-production of carotenoids and xylitol by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 2, p. 139-141, 1997.

PARAJO, J. C.; SANTOS, V.; VAZQUEZ, M. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 181-187, 1998a.

PARAJO, J. C.; SANTOS, V.; VAZQUEZ, M. Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* growing on media made from hemicellulosic hydrolysates of *Eucalyptus globulus* wood. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, n. 4, p. 501-506, 1998b.

PAREKH, S.; VINCI, V. A.; STROBEL, R. J. Improvement of microbial strains and fermentation processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 3, p. 287-301, 2000.

PERSIKE, D. S. et al. Invertase and urease activities in the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (formerly *Phaffia rhodozyma*). **Bioresource Technology**, v. 82, n. 1, p. 79-85, 2002.

RAMÍREZ, J.; GUTIERREZ, H.; GSCHAEDLER, A. Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through factorial design and response surface methodology. **Journal of Biotechnology**, v. 88, n. 3, p. 259-268, 2001.

RAMÍREZ, J.; NUÑEZ, M. L.; VALDIVIA, R. Increased astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant grown on date juice from *Yucca fillifera*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 187-190, 2000.

REYNDERS, M. B.; RAWLINGS, D. E.; HARRISON, S. T. L. Demonstration of the Crabtree effect in *Phaffia rhodozyma* during continuous and fed-batch cultivation. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 6, p. 549-552, 1997.

REYNDERS, M. B.; RAWLINGS, D. E.; HARRISON, S. T. L. Studies on the growth, modelling and pigment production by the yeast *Phaffia rhodozyma* during fed-batch cultivation. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 6, p. 649-654, 1996.

SANGHA, R. P. K.; PATEL, T.; MARTIN, A. M. Growth and pigmentation in *Rhodotorula rubra* and *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 53-56, 1995.

SANPIETRO, L. M. D.; KULA, M. R. Studies of astaxanthin biosynthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*): effect of inhibitors and low temperature. **Yeast**, v. 14, n. 11, p. 1007-1016, 1998.

SANTOPIETRO, L. M. D. et al. Effects of oxidative stress on the production of carotenoid pigments by *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). **Folia Microbiologica**, v. 43, n. 2, p. 173-176, 1998.

SANTOPIETRO, L. M. D.; SPENCER, J. F. T. SENERIZ, F. Fed-batch and continuous culture of *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). **Folia Microbiologica**, v. 43, n. 2, p. 169-172, 1998.

SCHROEDER, W. A. et al. Selection for carotenogenesis in the yeast *Phaffia rhodozyma* by dark-generated singlet oxygen. **Microbiology-UK**, v. 142, n. 10, p. 2923-2929, 1996.

SCHROEDER, W. A.; JOHNSON, E. A. Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. **Journal of General Microbiology**, v. 139, n. 5, p. 907-912, 1993.

SCHROEDER, W. A.; JOHNSON, E. A. Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, n. 6, p. 502-507, 1995a.

SCHROEDER, W. A.; JOHNSON, E. A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 31, p. 18374-18379, 1995b.

SIGMA. **Catálogo: bioquímico e reagentes para pesquisas de ciências da vida**. Brasil: 2003, p. 920.

SLININGER, P. J. et al. Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, p. 371-384, 1982.

VAZQUEZ, M.; MARTIN, A. M. Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 3, p. 314-320, 1998.

VAZQUEZ, M.; SANTOS, V. 3-hydroxy-3',4'-didehydro-beta-psi-caroten-4-one (HDCO) from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) cultivated on xylose media. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 2, p. 181-182, 1998.

VAZQUEZ, M.; SANTOS, V.; PARAJO, J. C. Effect of the carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strains. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 263-268, 1997.

VAZQUEZ, M.; SANTOS, V.; PARAJO, J. C. Fed-batch cultures of *Phaffia rhodozyma* in xylose-containing media made from wood hydrolysates. **Food Biotechnology**, v. 12, n. 1/2, p. 43-55, 1998.

VERDOES, J. C.; MISAWA, N.; VAN OUYEN, A. J. J. Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, n. 6, p. 750-755, 1999.

YAMANE, Y. et al. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* enhanced in fed-batch culture with glucose and ethanol feeding. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 11, p. 1109-11, 1997a.

YAMANE, Y. I. et al. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4471-4478, 1997b.